



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



## **AVALIAÇÃO FARMACOGNÓSTICA E OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE FLAVONOIDES DE FLORES DE *Tagetes patula* ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO DE MISTURAS**

VANESSA MARQUITO MUNHOZ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração - Produtos naturais e sintéticos biologicamente ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:  
Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello  
Co-orientadora:  
Dra. Gisely Cristiny Lopes

MARINGÁ – 2013

Vanessa  
Marquito  
Munhoz

AValiação FARMACOGNÓSTICA E OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO  
DE FLAVONOIDES DE FLORES DE *Tagetes patula* ATRAVÉS  
DE PLANEJAMENTO DE MISTURAS

Mestrado  
PCF-UEM  
2013

VANESSA MARQUITO MUNHOZ

**AVALIAÇÃO FARMACOGNÓSTICA E OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO  
DE FLAVONOIDES DE FLORES DE *Tagetes patula* ATRAVÉS DE  
PLANEJAMENTO DE MISTURAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração - Produtos naturais e sintéticos biologicamente ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:

Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Co-orientadora:

Dra. Gisely Cristiny Lopes

MARINGÁ – 2013

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE PESQUISA OU ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

M966a Munhoz, Vanessa Marquito.

Avaliação farmacognóstica e otimização da extração de flavonoides de flores de *Tagetes patula* através de planejamento de misturas / Vanessa Marquito Munhoz. – Maringá, 2013.  
57 f. : il.

Orientador: João Carlos Palazzo de Mello.

Coorientador: Gisely Cristiny Lopes.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Tagetes – Teses. 2. Farmacognosia – Teses. 3. Flavonoides – Teses. 4. Plantas medicinais – Teses. 5. Química vegetal – Teses. I. Mello, João Carlos Palazzo de. II. Lopes, Gisely Cristiny. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Enfermagem. IV. Título.

CDU 615.32

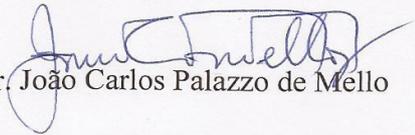
VANESSA MARQUITO MUNHOZ

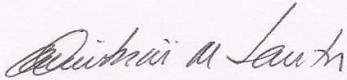
**AVALIAÇÃO FARMACOGNÓSTICA E OTIMIZAÇÃO DA  
EXTRAÇÃO DE FLAVONOÍDES DE FLORES DE *TAGETES PATULA*  
ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO DE MISTURAS**

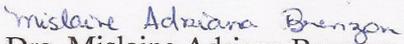
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 08 de novembro de 2013

**BANCA EXAMINADORA**

  
Dr. João Carlos Palazzo de Mello

  
Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos

  
Dra. Mislaine Adriana Brenzan

Este trabalho foi realizado no Laboratório PALAFITO, bloco K80, salas 13 e 14, da Universidade Estadual de Maringá.

Parte deste trabalho foi apresentado no XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, realizado em 2012 na cidade de Bento Gonçalves – RS.

Munhoz, V.M., Souza, J.R.P., Lopes, G.C., Mello, J.C.P. Controle de qualidade das flores de *Tagetes patula* In: XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2012, Bento Gonçalves. XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012. v.22. p.1.

Vanessa M. Munhoz; Renata Longhini; Tayara A. P. Silva; Audrey A. S. G. Lonni; José Roberto P. Souza; Gisely C. Lopes; João Carlos P. Mello. Estudo Farmacognóstico de Flores de *Tagetes patula* L. (Asteraceae)”, Revista Fitos, v.7, n.4, p.225-230, 2013.

Dedico esta dissertação a Deus, à minha família e ao meu amor Marcos Paulo, por todo incentivo e paciência.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por sempre me ouvir e me dar forças para seguir em frente.

À minha família por todo apoio e paciência.

Ao professor João Carlos Palazzo de Mello pela oportunidade, orientação, incentivo, confiança e amizade.

À Gisely Cristiny Lopes pela co-orientação, atenção, confiança, apoio e sua amizade, que permanece desde os tempos da graduação na Universidade Estadual de Londrina.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório, Maísa Almeida Leite, Lorena Pessini, Renata Longhini e Tânia Antonelli, por todo conhecimento compartilhado, ajuda e amizade.

Aos meus colegas de laboratório e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Maria Cristina DiCiaula, Letícia Krzyzaniak, Fernanda Giacomini Bueno, Ana Luiza Sereia, Milena Oliveira Jayme, Talita Naomi, Frederico M. Barros e Alexandre E. Reinas.

À Tayara Andressa Pytlak Silva pela colaboração no projeto.

Ao Admir Arantes e Cláudio Roberto Novello pelo auxílio técnico no laboratório e amizade.

Às queridas professoras Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni e Andréa Diniz por toda ajuda, amizade e apoio.

Aos professores Marcos Luciano Bruschi e Selma Lucy Franco pela ajuda e oportunidade.

À Helena pelo apoio, amizade e seu bom humor.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

À CAPES e CNPQ pelo incentivo financeiro.



Vanessa Marquito Munhoz nasceu em Bandeirantes, PR, em 19 de agosto de 1987. Em 1998 mudou-se com sua família para Goioerê, PR, por conta do trabalho de seu pai, mesmo motivo que a levou a mudar-se para Londrina em 2001. Estudou todo o ensino médio no Colégio de Aplicação da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e em 2006 ingressou no curso de farmácia, nesta mesma universidade. Durante o primeiro ano da graduação participou de projeto de iniciação científica na área de biotecnologia. Neste mesmo ano iniciou sua participação no projeto de extensão “Filtro solar e a prevenção do câncer de pele em servidores jardineiros da UEL”, no qual permaneceu até o fim deste em 2009. Devido a sua experiência no desenvolvimento e produção de filtro solar, teve como tema do trabalho de conclusão de curso “Avaliação do fator de proteção solar em fotoprotetores acrescidos com extratos da flora brasileira” sob orientação da professora Dra. Gisely Cristiny Lopes, cujos resultados foram publicados na Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v.33, n.2, p.225-232, 2012, intitulado “Avaliação do fator de proteção solar em fotoprotetores acrescidos com extratos da flora brasileira ricos em substâncias fenólicas, com autoria de: Vanessa Marquito Munhoz; Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni; João Carlos Palazzo de Mello; Gisely Cristiny Lopes. Em 2010 começou sua jornada na Universidade Estadual de Maringá (UEM), através da participação no projeto “Estudo biomonitorado de extrato de flores de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) para atividade antifúngica” no laboratório PALAFITO, sob orientação do professor Dr. João Carlos Palazzo de Mello. Em 2011 iniciou o mestrado acadêmico no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UEM no mesmo laboratório. Neste período apresentou um trabalho em congresso e teve um artigo publicado na Revista Fitos, relacionados com sua dissertação.

## RESUMO

*Tagetes patula* L. (Asteraceae), mais conhecida como cravo-de-defunto, tem suas flores usadas na medicina popular como antisséptica, diurética, depurativa do sangue e repelente de insetos, além de muito utilizada como ornamental. O presente trabalho foi conduzido para o desenvolvimento de parâmetros farmacognósticos de flores de *T. patula*, assim como a otimização do processo extrativo, com base no conteúdo de flavonoides totais, por meio do planejamento estatístico de misturas do tipo simplex-centroide, o qual possibilitou avaliar o efeito dos solventes água, etanol e acetona, assim como suas misturas, sobre esta resposta. Também foram avaliados o resíduo seco e capacidade antioxidante dos extratos produzidos. As avaliações foram realizadas de acordo com a Farmacopeia Brasileira e/ou literatura especializada. Testes colorimétricos detectaram a presença de flavonoides, taninos e fenólicos simples. Por meio de técnicas cromatográficas: cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência foi possível estabelecer a presença da substância quercetina. Os resultados para a perda por dessecação, teor de cinzas totais, teor de extrativos e teor em flavonoides totais foram, respectivamente:  $9,35\% \pm 0,2$  (2,10%),  $5,51\% \pm 0,2$  (3,61%),  $39,55\% \pm 0,52$  (1,31%) e  $5,24\% \pm 0,08$  (1,51%). O extrato obtido com acetona apresentou o maior conteúdo de flavonoides totais,  $25,13\% \pm 1,02$  (4,07%) e melhor capacidade antioxidante, com  $IC_{50}$  de  $15,74 \mu\text{g/mL} \pm 1,09$  (6,92%), porém com o menor resíduo seco,  $6,62\% \pm 1,33$  (20,10%). Os extratos nos quais foram utilizados água como líquido extrator exibiram maiores valores de resíduo seco, no entanto com o conteúdo de flavonoides totais e capacidade antioxidante menores que o extrato no qual utilizou-se acetona. A análise de correlação entre conteúdo de flavonoides totais e capacidade antioxidante dos extratos revelou que os flavonoides contribuem significativamente para esta capacidade. Assim, o planejamento de misturas possibilitou a otimização da extração dos flavonoides das flores de *T. patula*, tendo a acetona como melhor líquido extrator.

**Palavras chave:** *Tagetes patula*; Avaliação farmacognóstica; Flavonoides; Planejamento de misturas; Simplex-centroide.

## ABSTRACT

*Tagetes patula* L. (Asteraceae), commonly known as marigold, has its flowers used in folk medicine as an antiseptic, diuretic, purifying the blood and insect repellent, as well as widely used as ornamental. This study was conducted to develop the pharmacognostic evaluations for *T. patula* flowers, as well as to optimize the extraction process, based on the total flavonoid content, through statistical mixture design simplex-centroid, which allowed to evaluate the effect of the solvents water, ethanol and acetone, as well as mixtures thereof, on this response. Also were tested dry residue and antioxidant capacity of the extracts produced. These evaluations were performed according to the Brazilian Pharmacopoeia and/or specialized literature. Colorimetric assays detected the presence of flavonoids, tannins and simple phenolics. By thin layer chromatography and high performance liquid chromatography it was possible to determine the presence of the substance quercetin. The results for loss on drying, total ash content, extractives content and total flavonoid content were, respectively:  $9.35\% \pm 0.2$  (2.10%),  $5.51\% \pm 0.2$  (3.61%),  $39.55\% \pm 0.52$  (1.31%) e  $5.24\% \pm 0.08$  (1.51%). The extract with acetone had the highest total flavonoid content  $25.13\% \pm 1.02$  (4.07%) and better antioxidant capacity, with  $IC_{50}$  of  $15.74 \mu\text{g/mL} \pm 1.09$  (6.92%), but with lower dry residue,  $6.62\% \pm 1.33$  (20.10%). The extracts containing water as extractor liquid exhibited higher values of dry residue, but with the total flavonoid content and antioxidant capacity smaller than extract with acetone. The correlation between the total flavonoid content and antioxidant capacity of the extracts showed that flavonoids contribute significantly to this capacity. Thus, the statistical mixture design allowed the optimization of the extraction of flavonoids from the flowers of *T. patula*, with acetone as the best liquid extractor.

**Keywords:** *Tagetes patula*; Pharmacognostic evaluations; Flavonoids; Statistical mixture design; Simplex-centroid

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> Flores de <i>T. patula</i> cultivadas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Estadual de Londrina (foto: Vanessa M. Munhoz, nov/2011). .....   | 7  |
| <b>Figura 2</b> Região experimental de dois componentes (a) e três componentes (b). .....  | 13 |
| <b>Figura 3</b> Planejamentos experimentais: (a) simplex-lattice {3,3}; (b) simplex-centroide (q=3). .....   | 15 |
| <b>Figura 4</b> Representação esquemática do planejamento simplex-centroide para o sistema ternário. ....  | 23 |
| <b>Figura 5</b> Fluxograma de todo o trabalho realizado, partindo das flores de <i>T. patula</i> até a obtenção e análise dos extratos.....  | 26 |
| <b>Figura 6</b> Cromatograma realizado após pulverização com agente cromogênico específico (reagente natural). (A) sob luz natural (B) sob luz uv à 365 nm. (1) quercetina; (2) EB; (3) rutina. Condições cromatográficas: gel de sílica F <sub>254</sub> ; fase móvel: tolueno, acetato de etila, metanol e ácido fórmico (55:35:15:6; v/v). ....   | 29 |
| <b>Figura 7</b> Perfil cromatográfico por CLAE do EB de flores de <i>T. patula</i> . Pico correspondente a quercetina em 15,96 min. Condições cromatográficas: pré-coluna (4 x 3 mm d.i., 5 µm), C-18, coluna (250 x 4.6 mm d.i.; 5 µm), Phenomenex® gemini C-18; fase móvel: água (fase A) e acetonitrila (fase B); 0 min: 10% fase B; 5 min: 25% fase B; 10 min: 35% fase B; 15 min: 35% fase B; 25 min: 50% fase B; 28 min: 10% fase B; 35 min: 10% fase B; vazão: 1,0 ml/min; detecção: 210 nm. .... | 30 |
| <b>Figura 8</b> Superfície de resposta do resíduo seco para os 7 extratos produzidos de acordo com o simplex-centroide composto por acetona, etanol e água. ....   | 32 |
| <b>Figura 9</b> Curvas de nível do resíduo seco para os 7 extratos produzidos de acordo com o simplex-centroide composto por acetona, etanol e água.....   | 32 |
| <b>Figura 10</b> Desejabilidade calculada no Statistica® para obter valores ótimos de resíduo seco.....  | 33 |
| <b>Figura 11</b> Cromatograma realizado após pulverização com agente cromogênico específico (reagente natural). (A) sob luz natural (B) sob luz UV à 365 nm. (1) quercetina; (2) rutina; (3) EBRA; (4) EBRE; (5) EBRAc; (6) EBRAAc; (7) EBREA; (8) EBREAc; (9) EBRAEAc. Condições cromatográficas: gel de sílica F <sub>254</sub> ; fase móvel: tolueno, acetato de etila, metanol e ácido fórmico (55:35:15:6; v/v). ....   | 34 |
| <b>Figura 12</b> Curva analítica da absorvância da solução padrão de quercetina em diferentes concentrações. ....  | 35 |
| <b>Figura 13</b> Superfície de resposta do conteúdo de flavonoides totais para os 7 extratos produzidos de acordo com o simplex-centroide composto por acetona, etanol e água. ....  | 36 |
| <b>Figura 14</b> Curvas de nível do conteúdo de flavonoides totais para os 7 extratos produzidos de acordo com o simplex-centroide composto por acetona, etanol e água. ....   | 37 |
| <b>Figura 15</b> Desejabilidade calculada no Statistica® para obter valores ótimos de conteúdo de flavonoides totais. ....   | 37 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 16</b> Superfície de resposta da capacidade antioxidante dos 7 extratos produzidos de acordo com o simplex-centroide composto por acetona, etanol e água. ....  | 39 |
| <b>Figura 17</b> Curvas de nível da capacidade antioxidante dos 7 extratos produzidos de acordo com o simplex-centroide composto por acetona, etanol e água. ....   | 39 |
| <b>Figura 18</b> Desejabilidade calculada pelo Statistica® para obter extratos com ótima capacidade antioxidante. ....  | 40 |
| <b>Figura 19</b> Correlação (análise de regressão simples) entre a capacidade antioxidante através da porcentagem de inibição do radical DPPH, e o conteúdo de flavonoides dos 7 extratos produzidos por simplex-centroide, composto por acetona, etanol e água. .... | 40 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> Composição das misturas acetona, etanol e água de acordo com o planejamento simplex-centroide.....  | 23 |
| <b>Tabela 2</b> Polaridade dos solventes de acordo com Snyder (1978) .....  | 24 |
| <b>Tabela 3</b> Características físico-químicas de flores de <i>T. patula</i> .....   | 27 |
| <b>Tabela 4</b> Análise fitoquímica preliminar das flores de <i>T. patula</i> .....   | 28 |
| <b>Tabela 5</b> Resíduo seco, flavonoides totais e capacidade antioxidante dos diferentes extratos obtidos por planejamento simplex-centroide, com misturas de acetona, etanol e água. .... | 31 |

## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

BHT: butilhidróxitolueno

$AlCl_3$ : cloreto de alumínio

CCD: cromatografia em camada delgada

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

v/v: volume/volume

p/v: peso/volume

p/p: peso/peso

EB: extrato bruto

EBRAc: extrato bruto respectivo acetona

EBRE: extrato bruto respectivo etanol

EBRA: extrato bruto respectivo aquoso

EBREAc: extrato bruto respectivo etanol: acetona

EBRAAc: extrato bruto respectivo água: acetona

EBREA: extrato bruto respectivo etanol: água

EBREAAc: extrato bruto respectivo etanol: acetona: água

CFT: conteúdo de flavonoides totais

BBT: 5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitienil

BBTOH: 5-(4-hidroxi-1-butinil)-2,2'-bitienil

BBTOAc: 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitienil

$\alpha$ -Tertienil: 2,2':5',2''-tertienil

PBT: 5-(3-peten-1-inil)-2,2'-bitienil

BBT(OAc)<sub>2</sub>: 5-(3,4-diacetoxi-1-butinil)-2,2'-bitienil

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO.....  | 1  |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA.....   | 3  |
| 2.1 SISTEMÁTICA VEGETAL DE <i>Tagetes patula</i> L.....                        | 3  |
| 2.1.1 Família ASTERACEAE .....   | 3  |
| 2.1.2 Gênero <i>Tagetes</i> L.....   | 4  |
| 2.1.3 <i>Tagetes patula</i> L.....   | 6  |
| 2.2 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE DROGAS VEGETAIS.....                             | 11 |
| 2.3 PLANEJAMENTO DE MISTURAS .....   | 12 |
| 3 OBJETIVOS.....   | 17 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL.....  | 17 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 17 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS.....  | 18 |
| 4.1 MATERIAIS .....  | 18 |
| 4.1.1 Solventes e Reagentes .....  | 18 |
| 4.1.2 Equipamentos.....  | 18 |
| 4.1.3 Droga vegetal .....  | 19 |
| 4.2 CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL .....                                      | 19 |
| 4.2.1 AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA .....   | 19 |
| 4.2.1.1 Determinação da perda por dessecação em balança de infravermelho ..... | 19 |
| 4.2.1.2 Determinação de cinzas totais .....                                    | 19 |
| 4.2.1.3 Determinação do teor de extrativos.....                                | 19 |
| 4.2.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR.....                                      | 20 |
| 4.2.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA .....   | 20 |
| 4.2.3.1 Preparação da amostra.....   | 20 |
| 4.2.3.2 Cromatografia em camada delgada .....                                  | 20 |
| 4.2.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência.....                          | 21 |
| 4.2.4 Determinação de flavonoides totais .....                                 | 21 |
| 4.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO EMPREGANDO O SISTEMA SIMPLEX-CENTROIDE .....   | 22 |
| 4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS.....   | 24 |
| 4.4.1 Resíduo seco.....  | 24 |
| 4.4.2 Cromatografia em camada delgada .....                                    | 24 |
| 4.4.3 Determinação de flavonoides totais .....                                 | 24 |
| 4.4.4 Capacidade antioxidante.....   | 25 |

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....       | 25 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....      | 27 |
| 6 CONCLUSÃO .....                   | 42 |
| REFERÊNCIAS .....                   | 43 |
| ANEXO 1 .....                       | 49 |
| ANEXO 2 – Artigo Revista Fitos..... | 52 |

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas, além de seu uso na medicina tradicional, são uma rica fonte de substâncias com potencial para a obtenção de novos fármacos e o desenvolvimento de fitoterápicos.

*Tagetes patula* L. (Asteraceae), mais conhecida como cravo-de-defunto, é encontrada em várias regiões do globo terrestre e juntamente com outras espécies do gênero *Tagetes*, vem sendo intensamente estudada quanto a sua composição química e propriedades biológicas.

No entanto, observa-se a concentração da atenção da comunidade científica sobre o óleo essencial e carotenoides das folhas e flores de *T. patula*, assim como os tiofenos de suas raízes, de modo que pesquisas com os compostos fenólicos ainda carecem de investimentos (Guinot et al., 2008). Os trabalhos existentes abordam o isolamento, identificação e atividades biológicas de flavonoides presentes na *T. patula*, porém não há nenhum estudo que avalie a extração destes metabólitos, no sentido de otimizar o processo.

O rendimento e o tipo de substâncias extraídas do material vegetal são influenciados por diversos fatores como: polaridade dos solventes, tempo e temperatura de extração, assim como o método extrativo e características físicas das amostras (Naczka & Shahidi, 2006; Wijekoon et al., 2011). No presente estudo todos estes fatores foram padronizados, com exceção do líquido extrator. Desta maneira utilizou-se o planejamento de misturas que permite identificar as interações entre os líquidos extratores utilizados, ou mesmo constatar que não há interação significativa entre eles, auxiliando na maximização ou minimização de uma resposta.

Os planejamentos experimentais para o estudo de misturas têm sido amplamente aplicado em diversas áreas, desde a engenharia de materiais, com o desenvolvimento de biofilmes (Mali et al., 2010), até a extração de produtos naturais (Garcia et al., 2010; Lonni et al., 2012), por exemplo. A principal finalidade de empregar esta metodologia é verificar como as respostas são afetadas pela variação das proporções dos componentes da mistura, sendo que a soma destas é igual a 1 ou 100% (Cornell, 1990). Na análise dos dados é utilizado um modelo matemático polinomial para relacionar as diferentes proporções às propriedades de interesse, com a determinação do melhor sistema (Campos et al., 2006).

Neste trabalho utilizou-se o planejamento estatístico de misturas através de um modelo simplex-centroide envolvendo acetona, etanol e água visando a otimização da extração dos flavonoides das flores de *T. patula*, de modo que o resíduo seco e a capacidade antioxidante dos extratos também foram avaliados.

Além disso, estabeleceram-se critérios de qualidade para a espécie, já que não existem relatos publicados sobre os parâmetros farmacognósticos para a avaliação da droga vegetal *T. patula*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 SISTEMÁTICA VEGETAL DE *Tagetes patula* L.

#### 2.1.1 Família ASTERACEAE

A família Asteraceae é, reconhecidamente, o grupo botânico mais numeroso dentro das Angiospermas, compreendendo, segundo Bremer (1994), cerca de 23000 espécies distribuídas em 1535 gêneros, dispostos em dezessete tribos e três subfamílias, representando 10% da flora mundial. A subdivisão apresentada por Bremer divide-se em:

- 1) Subfamília Barnadesioideae (92 spp.): Tribo Barnadesiae;
- 2) Subfamília Cichorioideae (6.700 spp.): Tribos Mutisieae, Cardueae, Lactuceae, Vernonieae, Liabeae e Arctoteae.
- 3) Subfamília Asteroideae (16.200 spp.): Tribos Inuleae, Plucheeae, Gnaphalieae, Calenduleae, Astereae, Anthemideae, Senecioneae, Helenieae, Heliantheae e Eupatorieae.

Através de estudos moleculares novas classificações foram sugeridas em relação ao número de subfamílias e tribos, entretanto, a classificação de Bremer (1994) ainda é a mais aceita pelos pesquisadores.

Em um estudo mais recente, Souza & Lorenzi (2008) relatam 24000–30000 espécies constituintes da família Asteraceae, com 1600-1700 gêneros, e estimam a presença de aproximadamente 250 gêneros e 2000 espécies no Brasil.

Apesar de possuir grande diversidade, apresenta-se em sua maior parte, como ervas perenes, subarbustos e arbustos, mas existem raramente, também, árvores (Heywood, 1993). Possui distribuição cosmopolita, sendo encontrada principalmente na região sudoeste dos Estados Unidos, México, Brasil, ao longo dos Andes, no mediterrâneo e nas regiões sul, sudoeste e central da Ásia e Austrália (Bremer, 1994). No Brasil há espécies nativas e algumas introduzidas, as quais aclimataram-se devido a sua grande capacidade adaptativa (Matzenbacher, 2003).

Esta família vem sendo extensivamente estudada, quanto à sua morfologia, ontogenia, citogenética, ecologia, composição química e atividade biológica (Capelari-Oliveira et al., 2011; Li et al., 2013). Através de trabalhos científicos realizados houve o isolamento de diversos metabólitos secundários, entre eles as lactonas sesquiterpênicas, constituintes característicos dessa família (Picman, 1986) e em destaque os flavonoides, considerados importantes marcadores quimiotaxonômicos (Emerenciano et al., 2001).

As plantas da família Asteraceae são cultivadas para fins ornamentais, alimentício, medicinais e inseticida (Beretta et al., 2008).

### 2.1.2 Gênero *Tagetes* L.

*Tagetes* L., pertencente à família Asteraceae e tribo Heliantheae, contém aproximadamente cinquenta espécies, anuais ou perenes, sendo que *T. minuta*, *T. erecta*, *T. patula* e *T. tenuifolia* são as mais comumente encontradas (Vasudevan et al., 1997).

Apesar do *Tagetes* ser nativo do México e outras regiões quentes da América, é cultivado em todo o mundo como planta ornamental (Bano et al., 2002). Normalmente apresenta-se como arbustos, com a presença em suas folhas e brácteas, de glândulas contendo óleos essenciais (Abdala, 2001).

Algumas espécies são usadas popularmente para diversos fins, desde terapêutico, como para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, por exemplo, até como repelentes e inseticidas (Zardini, 1984).

De acordo com Xu et al. (2012), foram identificadas 126 substâncias presentes em espécies do gênero *Tagetes*, como compostos fenólicos, alcaloides, carotenoides, tiofenos, benzofuranos, terpenoides, esteroides, e cumarinas (Mejia-Barajas et al., 2012), com o predomínio de alguns destes em órgãos específicos da planta. Como exemplo tem-se o óleo essencial e flavonoides, preferencialmente produzidos nas folhas e flores; os carotenoides presentes somente nas pétalas e os tiofenos, encontrados principalmente nas raízes (Marotti et al., 2010).

O óleo essencial de *Tagetes*, produzido comercialmente, é obtido da parte aérea de *T. minuta*, *T. patula* e *T. erecta*, e utilizado na produção de sofisticados perfumes (Bano et al., 2002; Ibrahim & Kiranmai, 2012). Além disso, demonstrou um grande potencial para o controle de pragas na agricultura e de vetores ou agentes etiológicos de doenças.

López et al. (2011) demonstraram que o óleo essencial de *T. rupestris* apresenta atividade inseticida contra *Ceratitis capitata* Wiedemann, conhecido como mosca do mediterrâneo, causadora de sérios danos aos frutos de diversas culturas. Ainda neste trabalho, o óleo essencial de *T. minuta* e *T. filifolia* mostraram-se repelentes para o *Triatoma infestans* Klug, mais conhecido como “barbeiro” e um dos transmissores da doença de Chagas.

O óleo essencial de *T. minuta* apresentou atividade inseticida contra o causador da pediculose, *Pediculus humanus capitis* (Cestari et al., 2004), carrapaticida (Andreotti et al., 2013) e atividade antimicrobiana (Upadhyaya et al., 2010). Já para o óleo essencial de *T. erecta* é relatada atividade larvicida diante das espécies de mosquito *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus*, transmissores da dengue e febre amarela, malária e filaríose, respectivamente (Pathak et al., 2000), e atividade esquistosomicida *in vitro* contra a forma adulta de *Schistosoma mansoni*, assim como reduziu o desenvolvimento de ovos deste parasita (Tonuci et al., 2012).

Extratos orgânicos de flores, folhas e raízes de espécies do gênero *Tagetes* apresentaram atividades antibacteriana (Tereschuk et al., 1997; Tereschuk et al., 2003; Rhama & Madhavan, 2011; Ibrahim & Kiranmai, 2012), antifúngica (Mares et al., 2004), larvívica (Macêdo et al., 1997; Nikkon et al., 2011), citotóxica (Mejia-Barajas et al., 2012), hipoglicêmica (Rodda et al., 2011) e hepatoprotetora (Giri & Bosc, 2011).

Quanto ao extrato aquoso, Guadarrama-Cruz et al. (2008) comprovaram através de testes em ratos que o extrato de partes aéreas de *T. lucida* possui efeito antidepressivo semelhante à fluoxetina, com dose mínima efetiva de 10 mg/kg/dia.

A atividade herbívica de pó de folhas secas de *T. minuta* é relatada por Batish et al. (2007), que constataram que este material vegetal aplicado na dose de 1 a 2 t/ha ao solo com cultivo de arroz, reduziu o surgimento e crescimento das plantas daninhas *Echinochloa crus-galli* e *Cyperus rotundus*, além do aumento da produtividade dos grãos de arroz. Este último efeito, segundo os autores pode ser devido às atividades fungívica, insetívica e nematívica relatadas para os extratos de *T. minuta* e o seu óleo essencial (Tereschuk et al., 1997; Tomova et al., 2005; Upadhyaya et al., 2010).

A ação de espécies do gênero *Tagetes* sobre nematoides é amplamente estudada, sendo relatada há mais de 50 anos (Steiner, 1941). São conhecidos quatorze gêneros de nematoides sensíveis ao *Tagetes*, no entanto os mais afetados são o *Pratylenchus* e o *Meloidogyne* (Suatmadji, 1969).

*Tagetes* é fonte abundante de tiofenos, substâncias heterocíclicas com potencial biocídica, presentes em plantas da família Asteraceae (Tosi et al., 1988; Szarka et al., 2010). Os principais tiofenos relatados para o gênero são 5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitienil (BBT), 5-(4-hidroxi-1-butinil)-2,2'-bitienil (BBTOH), 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitienil (BBTOAc) e 2,2':5',2''-tertienil ( $\alpha$ -tertienil). Estas substâncias são acumuladas nas raízes destas plantas, mas também podem ser encontradas nas flores e folhas, porém em menor quantidade (Marotti et al., 2010).

Dentre os quatro tiofenos citados, dois (BBT e  $\alpha$ -tertienil) são fototóxicos, assim apresentam melhor atividade biocídica quando fotoativados. Chan et al. (1975) isolaram os compostos BBT e  $\alpha$ -tertienil de raízes de *T. patula*, os quais demonstraram atividade fototóxica contra *Candida albicans*. Ainda, de acordo com os autores,  $\alpha$ -tertienil pode provocar fotodermatite na pele humana caracterizado por grave eritema e hiperpigmentação de longa duração.

Mares et al. (2004) avaliaram a atividade do extrato metanólico de *T. patula* sob os fungos fitopatogênicos *Botrytis cinerea*, *Fusarium moniliforme* e *Phthium ultimum*, em ambiente claro e escuro. No escuro o extrato inibiu o crescimento dos três fungos somente na maior concentração (50  $\mu$ g/mL), ao contrário das amostras irradiadas, nas quais foram

obtidos melhores resultados em concentrações menores. De acordo com os autores, a atividade fungitóxicas do extrato na ausência de luz é devido à presença do tiofeno BBTOH, o qual no escuro apresentou-se mais ativo que o  $\alpha$ -tertienil. Este necessita ser fotoativado para apresentar toxicidade, pois a presença da irradiação solar levaria a formação de oxigênio singleto ou radicais livres (Hudson et al., 1986), que seriam os responsáveis pelos danos no sistema endomembranar dos fungos (Mares et al., 1990).

Além da atividade antifúngica os tiofenos possuem atividade inseticida, antiviral, citotóxica e nematocida (Gommers & Bakker, 1988; Arnason et al., 1989; Marles et al., 1992; Cork et al., 2006). Muitos estudos recomendam o plantio de *Tagetes* na bordadura do cultivo principal ou em rotação de culturas, para o controle dos nematoides no solo de pequenas propriedades. Espécies deste gênero são consideradas antagonistas para nematoides, por não permitirem o desenvolvimento destes até a fase adulta, através da liberação de substâncias radiculares com ação tóxica (Seigies & Pritts, 2006; Peres et al., 2009).

As pétalas de flores de *Tagetes* ricas em carotenoides, principalmente a luteína e seus ésteres, são uma rica fonte natural de pigmentos amarelos utilizados para melhorar a coloração de frangos e ovos e como corante em outros alimentos, com uso aprovado pela União Européia (E161b) (Quackenbush & Miller, 1972; EC, 1995; Vasudevan et al., 1997). Além disso, a luteína e os flavonoides presentes nas flores de *Tagetes*, por apresentarem capacidade antioxidante, têm atraído o interesse das indústrias para o desenvolvimento de suplementos alimentares (Wang et al., 2006; Gong et al., 2012).

### 2.1.3 *Tagetes patula* L.

*T. patula* (Figura 1) é uma planta herbácea anual, possui caule baixo, de 20-30 cm de altura, de folhagem de coloração verde escura e com cheiro característico. Suas flores estão dispostas em capítulos simples ou dobrados, solitários, as quais podem apresentar três tonalidades: amarelo, alaranjado e marrom-avermelhado (Lorenzi & Souza, 1995).

De acordo com Lorenzi & Souza (1995) esta espécie é uma planta de pleno sol e grande resistência, com a possibilidade de ser cultivada em regiões tropicais durante o período do verão.

Popularmente conhecida como cravo-francês, cravo-de-defunto ou botões-de-solteirão, tem origem no México. Foi introduzida em regiões da Ásia, Europa e América, incluindo o Brasil, onde se aclimatou perfeitamente, tornando-se subespontânea. Suas flores têm sido utilizadas na medicina tradicional como antisséptica, diurética, depurativa do sangue e repelente de insetos. Suas folhas são empregadas em problemas renais e dores musculares e suas raízes e sementes são usadas como purgativas (Chadha, 1976). No entanto a espécie é utilizada em larga escala como ornamental de jardins e floreiras, sendo

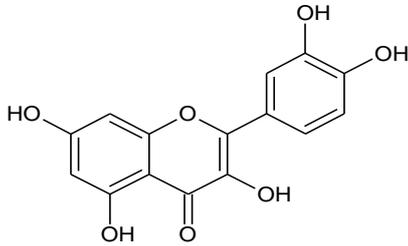
comercializada livremente nas feiras populares e em floriculturas. Na Índia suas flores são usadas em guirlandas para eventos sociais e religiosos (Vasudevan et al., 1997).



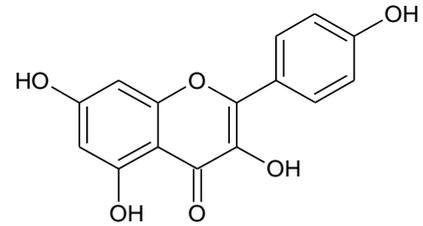
Figura 1 Flores de *T. patula* cultivadas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Estadual de Londrina (Foto: Vanessa M. Munhoz, nov/2011).

Esta espécie é uma fonte comercial importante de carotenoides e óleo essencial (Garg et al., 1999). As pétalas de *T. patula* são ricas em carotenos, identificados por Piccaglia et al. (1998) como luteína e seus ésteres, dimiristato, miristato-palmitato, dipalmitato e palmitato-estearato como majoritários, de modo que a forma mais comumente encontrada seja a luteína esterificada. Garg et al. (1999) isolaram a luteína dipalmitato, usado em formulações oftálmicas, além dos flavonoides patuletina (3), patuletrina (4) e 2-metil-6-metileno-2,7-octadieno 1-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, um monoterpene glicosídico acíclico. Outro terpeno isolado em flores de *T. patula* foi o lupeol e os esteroides  $\beta$ -sitosterol

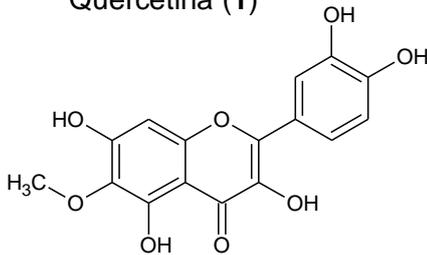
e estigmasterol (Bano et al., 2002) e um raro alcaloide  $\beta$ -carbolina, denominado jafrine (Faizi & Naz, 2002).



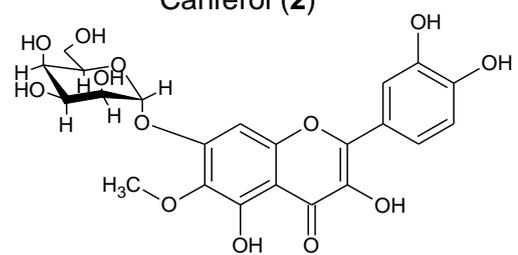
Quercetina (1)



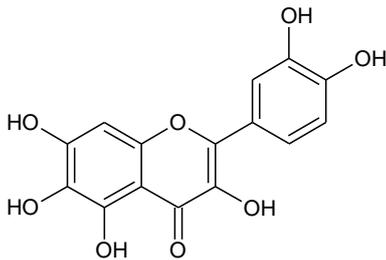
Canferol (2)



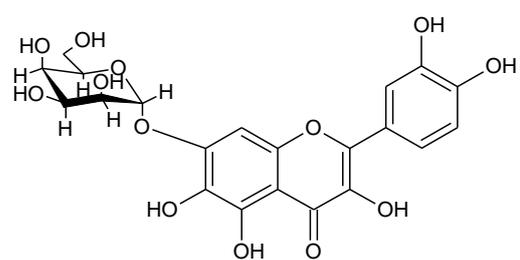
Patuletina (6-metoxiquercetina) (3)



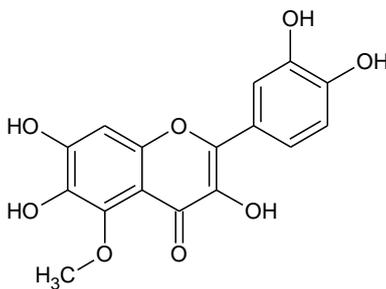
Patuletrina (patuletina-7-O-glicosídeo) (4)



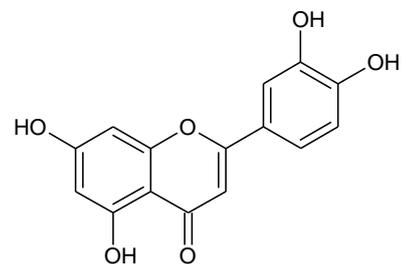
Quercetagetina (6-hidroxi-quercetina) (5)



Quercetagetrina  
(quercetagetina-7-O-glicosídeo) (6)



Quercetagetina 5-metil-éter (7)



Luteolina (8)

Além de **3** e **4** (Bhardwaj et al., 1980; Garg et al., 1999; Guinot et al., 2008), são relatados a presença nas flores da espécie dos flavonoides: quercetina (**1**), canferol (**2**)

(Ivancheva & Zdravkova, 1993), quercetagetina (**5**), quercetagetrina (**6**), quercetagetina 5-metil-éter (**7**) e luteolina (**8**) (Bhardwaj et al., 1980).

De acordo com Faizi et al. (2008), extratos da parte aérea, raízes e sementes de *T. patula* exibiram atividade antibacteriana e antifúngica, porém os extratos das flores, enriquecidos em flavonoides, mostrou maior potencial. O flavonoide **3** apresentou atividade antibacteriana diante de *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Micrococcus luteus* com concentração inibitória mínima (CIM) de 12,5 µg/disco. A atividade antibacteriana do extrato etanólico de flores de *T. patula* contra *Staphylococcus aureus*, além de *S. epidermidis* e *Escherichia coli*, também foi comprovada por Ramya et al. (2012), no qual o diâmetro do halo de inibição na concentração do extrato de 150 µg/mL foi 15,5±1,06, 12,5±1,18 e 11,5±1,06 mm, respectivamente. Além da ação antibacteriana, a substância **3** exibiu boa capacidade de tingimento de lã, mostrando-se como uma alternativa aos corantes sintéticos para a indústria têxtil (Guinot et al., 2008).

O extrato metanólico de flores de *T. patula*, assim como suas frações polares demonstraram potencial atividade antioxidante, sendo que a avaliação das substâncias isoladas protocatecuato de metila, **3**, **4** e os padrões obtidos comercialmente rutina e quercetina, demonstraram valores de IC<sub>50</sub>, ou seja, a concentração necessária para inibir 50% do radical DPPH, entre 3 e 13,17 µg/mL. Este extrato também foi avaliado em relação a sua atividade analgésica em camundongos através do ensaio utilizando ácido acético. O extrato na concentração de 100 mg/kg provocou redução de cerca de 34% no número de contorções, enquanto que **3** foi capaz de reduzir 66% o número de contorções na concentração de 0,33 mg/kg e com valor de IC<sub>50</sub>, concentração necessária para reduzir em 50% o número de contorções, de 130 vezes menor que o da aspirina, sugerindo que essa substância trata-se de um potente composto analgésico com ação no sistema periférico, além deste não apresentar toxicidade em concentrações de 100 mg/kg (Faizi et al., 2011a).

O estudo da ação anti-inflamatória do extrato metanólico das flores de *T. patula* em camundongos, demonstrou que o extrato reduziu significativamente o edema de pata induzido por α-carragenina, bem como por outros mediadores químicos, como histamina e serotonina. Ainda, controlou a permeabilidade vascular, mostrando-se efetivo no tratamento da inflamação aguda. Já na inflamação crônica foi incapaz de inibir a formação de grânulos (Kasahara et al., 2002).

Assim como outras espécies de *Tagetes*, o *T. patula* produz substâncias com atividade nematicida. Faizi et al. (2011b) isolaram compostos do extrato metanólico de flores amarelas de *T. patula* desengorduradas com éter de petróleo, assim como de suas frações, e os avaliaram quanto a sua atividade nematicida *in vitro* contra *Heterodera zae*. Das frações do extrato metanólico foram isolados o tiofeno α-tertienil, os triterpenos α- e β-

amirina e os flavonoides **3** e **4**. Além destes, foram identificados nas frações apolares a presença de BBT,  $\alpha$ - e  $\beta$ -tocoferol, ácido benzoico, ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos de cadeia longa e hidrocarbonetos.

A fração contendo  $\alpha$ -tertienil exibiu 100% de mortalidade na concentração de 1,5 mg/mL, após 24 h sob a luz. Nestas mesmas condições, mas em ambiente escuro, provocou 90% de mortalidade. Porém o  $\alpha$ -tertienil obtido comercialmente provocou 100% de mortalidade na concentração de 1,25  $\mu$ g/mL após 24 h, em ambiente claro e escuro. Frações moderadamente polares também mostraram atividade, sendo que as frações acetato de etila contendo **3** e **4** obtiveram 100% de mortalidade após 24 h na concentração de 0,6 mg/mL, sem diferenças em relação a luminosidade. No entanto, quando estes flavonoides foram testados isoladamente, mostraram-se menos ativos que suas frações em 24 h. Porém, **3** na concentração de 1,25  $\mu$ g/mL, após 72 h sob a luz, levou a 100% de mortalidade. A substância **1** nestas mesmas condições exibiu 80% de mortalidade. Os autores também relatam que ácidos fenólicos como ácido gálico levaram a 100% da mortalidade após 24 h na concentração de 1,25  $\mu$ g/mL e que, neste caso, os grupos hidroxila e metoxila são essenciais para a ação nematicida.

Além das flores da planta, suas raízes são ricas em tiofenos, com relatos para a espécie da presença de BBT, BBTOH, BBTOAc,  $\alpha$ -tertienil, 5-(3-penten-1-inil)-2,2'-bitienil (PBT), 5-(3,4-diacetoxi-1-butinil)-2,2'-bitienil (BBT(OAc)<sub>2</sub>), 5'-hidroximetil-5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitiofeno e 5'-metil-5-[4-(3-metil-1-oxobutoxi)-1-butinil]-2,2'-bitiofeno (Tosi et al., 1988; Bano et al., 2002; Szarka et al., 2010). Marotti et al. (2010) relatam que apenas 2,5% dos tiofenos estão presentes nas pétalas, enquanto 97,5% encontram-se nas raízes de *T. patula*.

Nas raízes de *T. patula* também foram isolados os benzofuranos 4-hidroxi-dihidrotremetona e hidroxitremetona (Sutfeld et al., 1985), além de ácido cítrico e málico que mostraram-se agentes hipotensores em ratos, em doses de 15 mg/kg e 30 mg/kg, respectivamente (Saleem et al., 2004).

Das folhas, flores e sementes de *T. patula* também extrai-se o óleo essencial, rico em terpenoides, em sua maioria mono e sesquiterpenos, hidrocarbonados e oxigenados. Dentre os sesquiterpenos, os principais compostos encontrados são  $\beta$ -cariofileno, (*E*)-cariofileno e óxido de cariofileno e os monoterpenos mais comuns são (*Z*)-ocimeno, (*E*)-ocimeno, (*Z*)- $\beta$ -ocimeno, limoneno, piperitona, piperitenona e terpinoleno (Romagnoli et al., 2005; Rondón et al., 2006; Szarka et al., 2006; Restello et al., 2009; Hassanpouraghdam et al., 2011; Prakash et al., 2012).

De acordo com Szarka et al. (2006), no óleo essencial de flores de *T. patula* também estão presentes os tiofenos BBT, PBT e  $\alpha$ -tertienil, enquanto o óleo de sementes apenas o  $\alpha$ -tertienil (Hassanpouraghdam et al., 2011).

Quanto às atividades biológicas, o óleo essencial de flores de *T. patula* apresentou atividade antifúngica (Romagnoli et al., 2005), enquanto o óleo de suas folhas demonstrou atividade larvicida (Dharmagadda et al., 2005), antibacteriana (Rondón et al., 2006), inseticida e repelente (Restello et al., 2009).

## 2.2 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE DROGAS VEGETAIS

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, 70 a 95% da população em países em desenvolvimento recorrem às plantas medicinais como forma de acesso aos cuidados básicos de saúde. Enquanto países desenvolvidos como Alemanha, Canadá, França e Itália também utilizam da medicina tradicional, porém de forma complementar (WHO, 2011).

No Brasil, foi aprovada por meio do Decreto N°5.813, de 22 de junho de 2006, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. O objetivo desta política é “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (Brasil, 2006).

Esta política visa “ampliar as opções terapêuticas aos usuários, com garantia de acesso às plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia, com segurança, eficácia e qualidade, considerando o conhecimento tradicional”. Ela engloba desde o cultivo da planta medicinal, com enfoque na agricultura familiar até o produto final, disponível ao usuário no Sistema Único de Saúde (Brasil, 2006).

Atualmente doze fitoterápicos compõem a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME), porém estados e municípios tem autonomia para fornecer fitoterápicos que expandem esta lista (Brasil, 2012).

Infelizmente no nosso país, um dos grandes desafios na utilização de plantas medicinais é devido à baixa qualidade das matérias-primas vegetais. Os problemas mais frequentes são a presença de matéria orgânica estranha e rotulagem inapropriada (Lucca et al, 2010; Barata, 2005; Narita et al, 2003). Somado a isto, as plantas possuem composição complexa, que é variável conforme aspectos internos e externos. Dentre os aspectos internos cita-se a influência da variabilidade genética, idade da planta e seu estágio de desenvolvimento. Os aspectos externos referem-se às condições ambientais do local de plantio, processo de coleta, manuseio e processamento do material vegetal (Ming, 1994; Fischer, 2005).

Os ensaios de qualidade da matéria-prima vegetal têm como objetivo verificar sua autenticidade através da verificação de sua identidade botânica, pureza, caracterização e quantificação dos seus constituintes químicos, especialmente daqueles envolvidos na atividade de interesse (Farias, 2003).

Para a verificação da identidade e pureza da droga vegetal preconiza-se inicialmente a análise sensorial para avaliação da coloração, consistência e odor. Somado a isto, a identificação botânica é realizada por meio de ensaios macro e microscópicos, bem como pela presença de constituintes químicos ativos e/ou característicos da espécie, detectados por reações químicas e cromatografia em camada delgada (Farias, 2003).

A caracterização cromatográfica é amplamente utilizada na análise de produtos vegetais. A determinação do perfil cromatográfico pode ser feita a partir de técnicas simples como a cromatografia em camada delgada e em papel, até as mais sofisticadas como a cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa, por exemplo, para análises de identificação, quantificação, além da detecção de contaminantes (Farias, 2003).

Para a análise da pureza do material vegetal, ensaios para a pesquisa de elementos estranhos, como partes da planta diferentes do farmacógeno, fragmentos de outras espécies, terra, areia e insetos, determinação do teor de cinzas e umidade, além da pesquisa de contaminação microbiológica, pesticidas e metais pesados podem ser utilizados (Farias, 2003).

Estes ensaios para a avaliação da qualidade de plantas medicinais estão presentes em monografias encontradas nas Farmacopeias dos Estados Unidos da América do Norte, China, Japão e Brasil, por exemplo (Ong, 2004; Brandão et al., 2006; Farmacopeia Brasileira, 2010).

Porém para as espécies desprovidas de monografia é fundamental o estabelecimento de padrões de qualidade para a consolidação da fitoterapia, como prática médica segura e eficaz.

### 2.3 PLANEJAMENTO DE MISTURAS

A metodologia utilizada para experimentos com misturas teve início com o trabalho de Henry Scheffé (Scheffé, 1958) e atualmente é bastante utilizada na ciência, engenharia e particularmente na indústria (Campos et al., 2006).

A resposta de um sistema químico pode ser influenciada por dois tipos de variáveis, as de processo e as de mistura. Fatores como pH, temperatura e concentração de reagentes são exemplos de variáveis de processo, consideradas independentes, já que o nível de uma variável de processo pode ser alterado de forma independente das demais, como acontece no planejamento fatorial (Coscione et al., 2005).

Por outro lado, as variáveis de mistura dependem da proporção relativa dos seus componentes, onde a soma destes é sempre igual a 1. Assim, a proporção de cada constituinte do sistema é considerada uma variável (variável de mistura), que é dependente das demais, pois o somatório destas deve ser 100%, com ausência de proporções negativas (Cornell, 1990). Isso em termos matemáticos, pode ser descrito como na Equação 1. Portanto a principal finalidade de se utilizar o delineamento de misturas é verificar como as respostas ou propriedades de interesse são afetadas pela variação das proporções dos componentes da mistura.

$$\sum_{i=1}^q x_i = x_1 + x_2 + \dots + x_q = 1 \quad \text{Eq. 1}$$

Onde:

$q$  = número de componentes da mistura

$x_i$  = componentes da mistura

Tais restrições reduzem a representação espacial das misturas, denominada de “simplex”. A região para a mistura de dois componentes é representada por uma reta, na qual cada ponto corresponde a uma mistura diferente (Figura 2a). Para o caso de três componentes o espaço da mistura é representado por um triângulo equilátero, onde os pontos situados nos vértices representam os componentes puros e sobre os lados, misturas binárias. Os pontos localizados no interior do triângulo correspondem às possíveis misturas ternárias (Figura 2b) (Vieira & Dal Bello, 2006).

Para misturas contendo quatro componentes, tem-se um tetraedro, enquanto que para um número maior de substâncias torna-se impossível representar a figura no espaço tridimensional (Reis & Andrade, 1996).

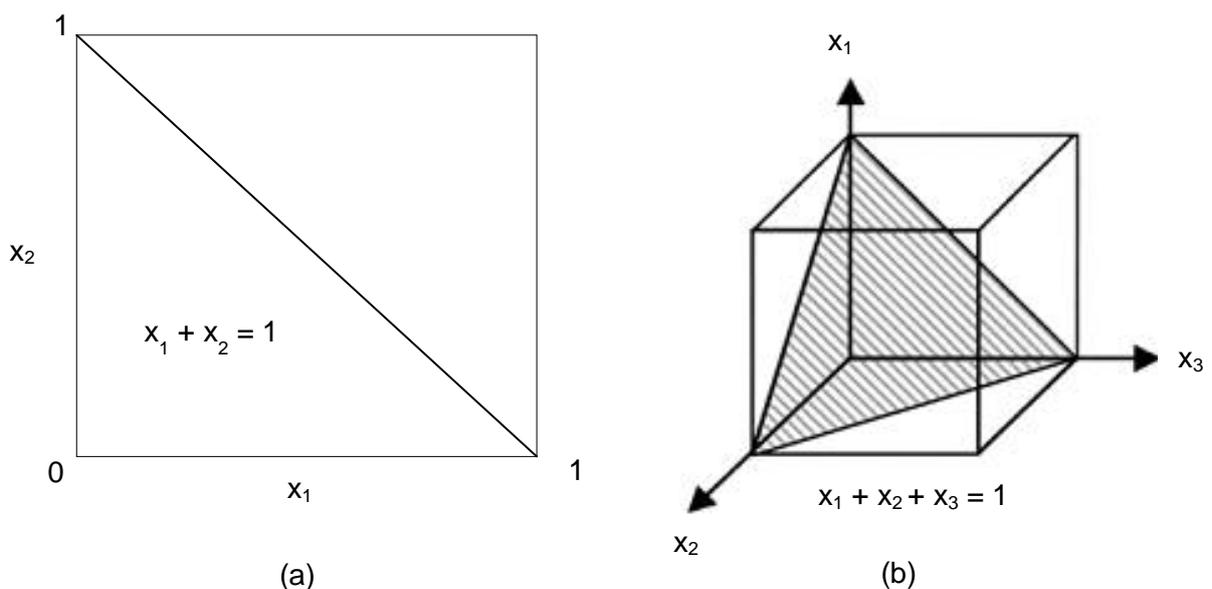


Figura 2 Região experimental de dois componentes (a) e três componentes (b).

Os planejamentos experimentais são montados neste “simplex”, e devem cobrir toda a região de interesse, pois a partir destes planejamentos são gerados modelos matemáticos que irão representar o comportamento do sistema de misturas em todo o espaço experimental (Reis & Andrade, 1996).

O “Simplex-Lattice”, desenvolvido por Scheffé, caracteriza-se por um arranjo simétrico de pontos, referidos como  $[q, m]$ , onde  $(q)$  é o número de componentes na mistura e  $(m)$  é o grau do polinômio a ser ajustado. Os pontos experimentais devem incluir todas as possíveis combinações envolvendo os componentes da mistura, como descrito na Equação 2, e o número de pontos é dado pela Equação 3 (Cornell, 1990):

$$x_i = 0, \frac{1}{m}, \frac{2}{m}, \dots, 1 \quad i = 1, 2, 3 \dots, q \quad \text{Eq. 2}$$

$$\text{N}^\circ \text{ Pontos } \{q, m\} = \frac{(q+m-1)!}{m!(q-1)} \quad \text{Eq. 3}$$

Onde:

$m!$  = fatorial do grupo polinomial

Devido a esta técnica estar atrelada ao posterior ajuste de modelos polinomiais referentes aos dados obtidos durante o experimento, o número de pontos a serem testados depende de  $(q)$  e do grau do polinômio que se deseja ajustar à superfície de resposta (Cornell, 1990).

Dessa forma, para uma mistura com três solventes  $(q=3)$  e  $(m = 3)$ , de acordo com a Equação 3 as proporções são combinações de  $x_i = 0, 1/3, 2/3, 1$ , totalizando dez experimentos conforme a Equação 4 e Figura 3a.

$$(x_1, x_2, x_3) = (1,0,0), (0,1,0), (0,0,1), \left(\frac{1}{3}, \frac{2}{3}, 0\right), \left(\frac{1}{3}, 0, \frac{2}{3}\right), \left(0, \frac{1}{3}, \frac{2}{3}\right), \left(\frac{2}{3}, \frac{1}{3}, 0\right), \left(\frac{2}{3}, 0, \frac{1}{3}\right), \left(0, \frac{2}{3}, \frac{1}{3}\right), \left(\frac{1}{3}, \frac{1}{3}, \frac{1}{3}\right)$$

$$\text{N}^\circ \text{ Pontos } \{3, 3\} = \frac{(3+3-1)!}{3!(3-1)} = 10 \quad \text{Eq. 4}$$

Alternativamente pode-se utilizar o planejamento do tipo “Simplex-Centroide”, que comparando-se ao Simplex-Lattice, também possibilita explorar toda a região simplex, com a diferença de utilizar os componentes da mistura somente em iguais proporções, sendo necessário um menor número de experimentos, incluindo o ponto central (Reis & Andrade, 1996).

De acordo com Cornell (1990), o número de pontos experimentais em um projeto simplex-centroide depende apenas do número de componentes da mistura e é dado pela Equação 5.

$$\text{N}^\circ \text{ Pontos} = 2^q - 1 \quad \text{Eq. 5}$$

Assim, para um sistema de três componentes, o planejamento simplex-centroide necessitará de apenas sete experimentos (Figura 3b)

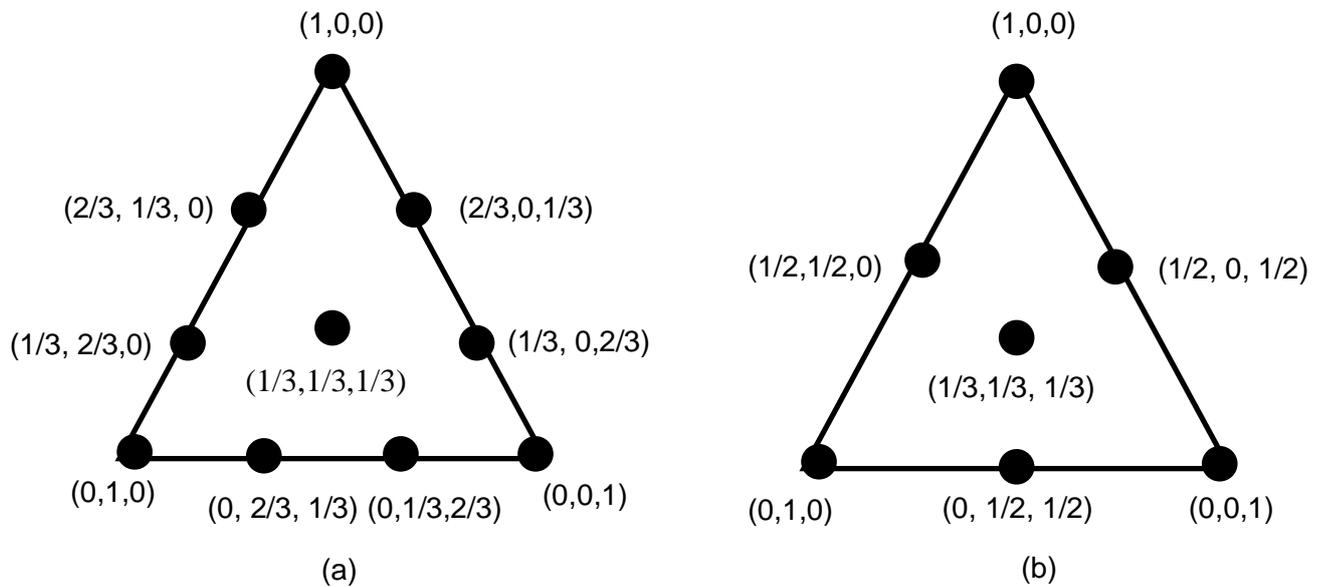


Figura 3 Planejamentos Experimentais: (a) Simplex-Lattice {3,3}; (b) Simplex-Centroide (q=3).

Os modelos matemáticos a serem ajustados aos dados experimentais foram sugeridos por Scheffé nas formas polinomiais descritas nas Equações 6 a 9, para misturas (Cornell, 1990):

Linear

$$E [y] = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i \quad \text{Eq. 6}$$

Quadrático

$$E [y] = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum \sum_{i < j}^q \beta_{ij} x_i x_j \quad \text{Eq. 7}$$

Cúbico Especial

$$E [y] = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum \sum_{i < j}^q \beta_{ij} x_i x_j + \sum \sum \sum_{i < j < k}^q \beta_{ijk} x_i x_j x_k \quad \text{Eq. 8}$$

Cúbico Completo

$$E [y] = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum \sum_{i < j}^q \beta_{ij} x_i x_j + \sum \sum \sum_{i < j < k}^q \beta_{ijk} x_i x_j x_k + \sum \sum_{i < j}^q \beta_{i-j} x_i x_j (x_i - x_j) \quad \text{Eq. 9}$$

Onde:

y = resposta avaliada

$\beta$  = coeficientes estimados pelo modelo

$x_{i,j,k} \dots, q$  = componentes da mistura

Os polinômios de Scheffé permitem correlacionar a composição de uma mistura com as suas propriedades (variáveis resposta).

O modelo linear fornece resultados apenas dos componentes puros sobre a resposta. Para a avaliação de interações entre duas substâncias da mistura, utiliza-se o método quadrático. Nas situações nas quais as interações entre três componentes devam ser consideradas utilizam-se os modelos cúbicos. O modelo cúbico completo necessita de dez pontos experimentais, porém há um modelo mais simples, o cúbico especial, que muitas vezes é suficiente para explicar os resultados (Braga, 2000).

A análise de superfície de resposta é uma ferramenta utilizada para a descrição gráfica do modelo, o que simplifica a interpretação dos resultados, através da estimativa do ponto ou região do espaço experimental que gera os melhores resultados para a resposta (Cornell, 1990).

Como citado anteriormente, o planejamento estatístico de misturas, além de ser aplicado na engenharia e indústria, também é usado na área de produtos naturais.

Garcia et al. (2010) utilizaram um planejamento simplex-centroide para avaliar o efeito do etanol, acetato de etila, diclorometano e acetona no rendimento do extrato bruto e das frações obtidas de folhas de *Mikania laevigata* Sch. Bip. De acordo com o modelo cúbico especial houve interações binárias sinérgicas entre etanol - acetato de etila, etanol - diclorometano, etanol - clorofórmio, acetato de etila – clorofórmio e entre o acetato de etila e diclorometano, que apresentaram um poder de extração maior que os solventes puros.

Trabalho semelhante realizado por Lonni et al. (2012), estudou o efeito do metanol, água, acetona e etanol, assim como de suas misturas, sobre o rendimento, conteúdo de polifenóis e atividade antioxidante de cascas de *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae). Como resultado a mistura quaternária com proporções iguais de cada componente resultou em maior rendimento do extrato bruto, polifenóis totais e atividade antioxidante.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer alguns parâmetros farmacognósticos das flores de *T. patula*, assim como a otimização do processo extrativo com base no conteúdo de flavonoides totais, por meio de planejamento experimental de misturas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar parâmetros de análise para flores secas de *T. patula*;
- Preparar extratos brutos liofilizados (EBR) de *T. patula* através do planejamento estatístico de misturas;
- Determinar a capacidade antioxidante dos extratos brutos frente ao radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH);
- Determinar o conteúdo de flavonoides totais nos EBR;
- Determinar o melhor sistema extrator para os flavonoides.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 Solventes e Reagentes

Todos os solventes e reagentes empregados possuíam grau de pureza pró-análise (p.a.) das marcas Mallinckrodt®, Merck®, Sigma®, Carlo Erba®, Vertec® ou Synth®, exceto quando especificado.

- Acetona, álcool de cereais cerealcool®, *n*-hexano, acetato de etila, metanol, acetonitrila, clorofórmio, tolueno;
- Ácido clorídrico, ácido acético, ácido fórmico, acetato de potássio, cloreto de alumínio, magnésio em pó, hidróxido de amônio, hidróxido de potássio, nitrato de prata amoniacal, metenamina, difenilborato de aminoetanol (reagente natural), macrogol 400, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), butilhidróxitolueno (BHT);
- Reagente de Dragendorff: subnitrato de bismuto, ácido nítrico e iodeto de potássio;
- Padrão primário de quercetina (Acros Organics®) e rutina (Fluka®);
- Placas de alumínio de gel de sílica 60 F<sub>254</sub> (Merck®).

#### 4.1.2 Equipamentos

- Estufa com sistema de circulação de ar (Pardal®)
- Moinho de martelos (Tigres® ASN5)
- Balança analítica (Marte®, AY220)
- Balança analítica dessecadora com sistema de infravermelho (Ohaus® MB35)
- Banho-maria (Fanem®, 120/3)
- Ultra-Turrax® (Ika Works, T-25)
- Turboextrator (Skymesen®, LS-04)
- Evaporador rotatório (Büchi® R-200)
- Liofilizador (Christ® Alpha 1-4)
- Mini agitador (LabDancer - IKA®)
- Micropipetas Eppendorf ® (20 a 5000 µL)
- Ultra-som (Elma®, T-460 35 Hz)
- Espectrômetro UV/Vis (OceanOptics® USB 2000+)
- Mufla (Fornitec®, F1 – DM Monofásico)
- Manta aquecedora (Fisatom®, 102)
- Chapa aquecedora (Built®, BLT FEP 2P)

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, Thermo® equipado com PDA (photo diode array), detector espectrofotométrico (modelo Finnigan Surveyor PDA Plus Detector), bombas e degasser integrado (Finnigan Surveyor LC Pump Plus), autosampler (Finnigan Surveyor Autosampler Plus), equipado com um loop de 10 µL e controlador de software Chromquest.

#### 4.1.3 Droga vegetal

Sementes de *T. patula* foram fornecidas por doação por Syngenta Seeds Ltda. (25/7/2011) e cultivadas organicamente no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. As flores de *T. patula* foram coletadas em novembro de 2011 e o material foi identificado pelo Prof. Dr. Jimi Naoki Nakagima, da Universidade Federal de Uberlândia. Material testemunho encontra-se depositado como documento taxonômico no Herbário da Universidade Estadual de Maringá sob o número HUEM 21.907.

As flores colhidas foram secas em estufa de circulação forçada de ar, aquecida à  $38 \pm 2$  °C durante 48 h, e cominuídas em moinho de martelos.

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL

#### 4.2.1 AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

##### 4.2.1.1 Determinação da perda por dessecação em balança de infravermelho (Farmacopeia Brasileira, 2010)

Amostras de aproximadamente 0,5 g de droga vegetal moída foram submetidas ao aquecimento (105 °C) por raios infravermelhos obtidos a partir de fonte halógena, pelo período de 30 min. Após este período obteve-se o percentual de umidade (p/p). A análise foi realizada em triplicata.

##### 4.2.1.2 Determinação de cinzas totais (Farmacopeia Brasileira, 2010)

Cerca de 2,00 g da amostra pulverizada foi transferida para cadinho previamente tarado. Distribuiu-se a amostra uniformemente no cadinho e iniciou-se a incineração aumentando, gradativamente, a temperatura até, no máximo,  $600 \pm 25$  °C, até que todo o carvão fosse eliminado. Resfriou-se o cadinho em dessecador, com posterior pesagem. Calculou-se a porcentagem de cinzas em relação à droga seca ao ar. A análise foi feita em quintuplicata.

##### 4.2.1.3 Determinação do teor de extrativos (Deutsches, 1986)

Cerca de 1,0 g da droga vegetal moída, exatamente pesada, foi submetida à decocção com 100,0 mL de água, durante 10 min. Após resfriamento, o volume foi

completado a 100,0 mL em balão volumétrico. A solução foi filtrada em papel de filtro e os primeiros 20,0 mL foram desprezados. Do restante do filtrado, uma alíquota correspondente a 20,0 mL, foi pesada em pesa-filtro previamente tarado e levado à evaporação até secura em banho-maria, sob agitação. O pesa-filtro contendo o resíduo foi colocado em estufa, à temperatura de 105 °C até peso constante. Em seguida, resfriado em dessecador e pesado, até peso constante. O teor de extrativos foi calculado em massa percentual, pela média de nove determinações, segundo a Equação 10:

$$TE = \frac{g.FD.100}{m - (m \times \frac{pd}{100})} \quad \text{Eq. 10}$$

Onde:

TE = teor de extrativos (%; p/p)

g = resíduo seco (g)

m = massa planta seca e moída (g)

FD = fator de diluição (5)

pd = perda por dessecação

#### 4.2.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR

A droga vegetal foi submetida à análise fitoquímica preliminar para detecção das principais classes de metabólitos secundários através de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração, espuma e/ou precipitação, característico para cada classe de substâncias estudadas: flavonoides, alcaloides, taninos, saponinas, cumarinas e fenólicos simples (Harborne, 1998).

#### 4.2.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

##### 4.2.3.1 Preparação da amostra

Para a obtenção do extrato, o material vegetal foi inicialmente desengordurado com *n*-hexano por maceração dinâmica durante seis dias. Após secagem, as flores desengorduradas ficaram em maceração por 10 min, utilizando como líquido extrator uma mistura etanol:água (1:1; v/v) na proporção de 2,5% (p/v) e em seguida foram submetidas à turbólise utilizando turboextrator Skymesen®, por um período de 9 min, com intervalos de 10 min, para que a temperatura não excedesse 40 °C. Após, o extrato foi filtrado, evaporado sob pressão reduzida e liofilizado (EB).

##### 4.2.3.2 Cromatografia em camada delgada (Wolf, 2008)

O cromatograma foi desenvolvido em câmara saturada, empregando como fase móvel uma mistura de tolueno, acetato de etila, metanol e ácido fórmico (55:35:15:6; v/v),

tendo como substâncias de referência, quercetina e rutina. O EB foi retomado em metanol na concentração de 1,45 mg/mL. Alíquotas do extrato (20 µL) e das soluções padrões (10 µL) foram adicionadas sobre a placa de alumínio de gel de sílica F<sub>254</sub> (100 x 50 mm), com o auxílio de micropipetas volumétricas, na forma de bandas. A placa foi desenvolvida a uma distância de 80 mm, à temperatura ambiente, em cuba cromatográfica saturada. Após o desenvolvimento, a cromatoplaça foi seca em estufa à temperatura de 105 °C, e em seguida pulverizada com difenilborato de aminoetanol a 1% (p/v) em metanol, seguido de uma solução de macrogol 400 a 5% (p/v) em metanol. Após, foi examinada sob luz ultravioleta (365 nm) para visualização das bandas.

#### 4.2.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

O EB foi retomado em metanol na concentração de 725 µg/mL. Foi empregado cromatógrafo líquido de alta eficiência da Thermo®. A temperatura do forno para coluna foi mantida em 25 °C e os cromatogramas foram observados a 210, 254 e 370 nm. Para o desenvolvimento dos cromatogramas foram utilizados pré-coluna (4 x 3 mm d.i.) e coluna (250 x 4,6 mm d.i.) C-18 Phenomenex®, modelo Gemini, porosidade 5 µm. A separação cromatográfica foi realizada utilizando água (fase A) e acetonitrila (fase B) em sistema gradiente, com vazão de 1,0 mL/min. O programa estabelecido foi: 0 min: 10% fase B; 5 min: 25% fase B; 10 min: 35% fase B; 15 min: 35% fase B; 25 min: 50% fase B; 28 min: 10% fase B; 35 min: 10% fase B.

#### 4.2.4 Determinação de flavonoides totais (Farmacopeia Brasileira, 2010)

Prepararam-se as seguintes soluções:

*Solução estoque:* Cerca de 0,1 g de droga pulverizada foi transferida para balão de fundo redondo de 100 mL, acrescentando-se 1 mL de solução aquosa de metenamina a 0,5% (p/v), 20 mL de acetona e 2 mL de ácido clorídrico. Aqueceu-se em banho-maria, sob refluxo, por 30 min e a mistura foi filtrada em algodão para um balão volumétrico de 100 mL, retornando o resíduo da droga e o algodão ao mesmo balão de fundo redondo, adicionando-se 20 mL de acetona sob refluxo, por 10 min. Após resfriamento até temperatura ambiente, a solução foi filtrada e esta operação repetida. Em seguida, completou-se o volume do balão volumétrico com acetona. Em funil de separação, adicionaram-se 20 mL dessa solução e 20 mL de água destilada e, após, extraiu-se com 15 mL de acetato de etila, repetindo-se esta operação três vezes, com porções de 10 mL de acetato de etila cada vez. As fases de acetato de etila foram reunidas e lavadas em funil de separação, com duas porções de 50 mL de água destilada. A fase de acetato de etila foi transferida para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com acetato de etila.

*Solução amostra:* a 10 mL da *solução estoque* foi adicionado 1 mL de solução de cloreto de alumínio a 2% (p/v) em solução de ácido acético 5% (v/v) em metanol. Diluiu-se em balão volumétrico de 25 mL com solução de ácido acético 5% (v/v) em metanol.

*Solução branco:* em balão volumétrico de 25 mL foram adicionados 10 mL da *solução estoque* e aproximadamente 15 mL da solução de ácido acético a 5% (v/v) em metanol. Exatamente após 30 min, foi medida a absorvância da *solução amostra* a 425 nm, em cubeta de quartzo de 1 cm, utilizando *solução branco* para ajuste do zero. Calculou-se o teor de flavonoides totais, expressos em quercetina, na amostra segundo a Equação 11. Considerou-se a absorvidade específica da quercetina como  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 500$ . A análise foi realizada em triplicata.

$$\text{TFT} = \frac{A \times 62.500}{500 \times m \times (100 - \text{PD})} \quad \text{Eq. 11}$$

Onde:

A = absorvância da *Solução amostra*

m = massa da droga (g)

PD = perda por dessecação (% p/p)

#### 4.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO EMPREGANDO O SISTEMA SIMPLEX-CENTROIDE

Para a obtenção dos extratos, procedeu-se conforme o item 4.2.3.1, porém, como líquido extrator foram utilizadas misturas de três componentes: ( $x_1$ ) acetona, ( $x_2$ ) etanol e ( $x_3$ ) água, determinados através de um planejamento simplex-centroide (Figura 4) obtido com o auxílio do programa Statistica® 8.0. As proporções de cada um dos solventes utilizados estão especificadas na Tabela 1.

Após, os extratos foram filtrados e evaporados sob pressão reduzida de modo a eliminar todo o solvente orgânico, e liofilizados, obtendo-se assim o extrato bruto seco (EBR) respectivo. Todos os extratos foram preparados em triplicata, de forma aleatória, para obter quantidade suficiente para futuros ensaios biológicos.

O método de extração empregado, a turbo-extração, baseia-se na extração com simultânea redução do tamanho da partícula, em consequência da aplicação de elevadas forças de cisalhamento, de forma que este processo leva ao rompimento das células e favorece a rápida dissolução das substâncias ativas, resultando em tempos de extração da ordem de minutos e o quase esgotamento da droga vegetal (Sonaglio et al, 2003).

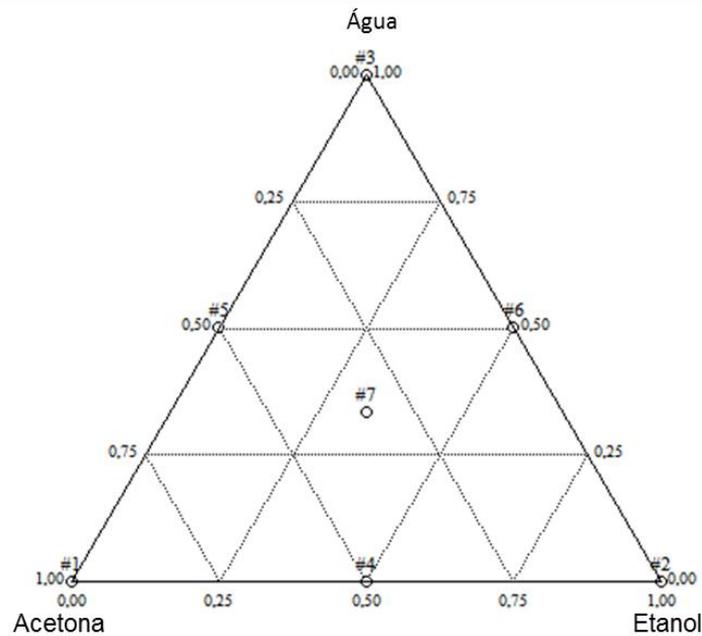


Figura 4 Representação esquemática do planejamento simplex-centroide para o sistema ternário.

Tabela 1 Composição das misturas acetona, etanol e água de acordo com o planejamento simplex-centroide.

| Extrato Bruto (EBR) | Componentes      |                 |               |
|---------------------|------------------|-----------------|---------------|
|                     | $x_1$<br>Acetona | $x_2$<br>Etanol | $x_3$<br>Água |
| 1 (EBRAc)           | 1,00             | 0,00            | 0,00          |
| 2 (EBRE)            | 0,00             | 1,00            | 0,00          |
| 3 (EBRA)            | 0,00             | 0,00            | 1,00          |
| 4 (EBREAc)          | 0,50             | 0,50            | 0,00          |
| 5 (EBRAAc)          | 0,50             | 0,00            | 0,50          |
| 6 (EBREA)           | 0,00             | 0,50            | 0,50          |
| 7 (EBREAAc)         | 0,33             | 0,33            | 0,33          |

A Tabela 2 traz a classificação dos solventes utilizados de acordo com sua polaridade (P), segundo Snyder (1978). Os valores de P para as misturas foram calculados de acordo com a equação 12.

$$P = \sum_{i=1}^n P_i Q_i$$

Eq. 12

Onde:

$n$ = número de solventes

$P_i$ = são os valores de polaridade dos solventes puros

$Q_i$ = proporções das misturas

Tabela 2 Polaridade dos solventes de acordo com Snyder (1978)

| Solvente                    | Polaridade (P) |
|-----------------------------|----------------|
| Água                        | 10,2           |
| Acetona:Água (1/1)          | 7,65           |
| Etanol:Água (1/1)           | 7,25           |
| Acetona:Água:Etanol (1/1/1) | 6,47           |
| Acetona                     | 5,1            |
| Acetona:Etanol (1/1)        | 4,7            |
| Etanol                      | 4,3            |

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

Após filtração da solução extrativa, houve a determinação do resíduo seco. Em seguida os extratos foram concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida e liofilizados, para as análises subsequentes.

##### 4.4.1 Resíduo seco

Alíquotas de 2,00 mL da cada extrato foram medidas volumetricamente e transferidas para pratos de inox, previamente tarados, estes foram então pesados e submetidos à evaporação até secura em banho-maria. Posteriormente, os pratos foram submetidos à temperatura de 105 °C durante 10 min, em balança de infravermelho. O resíduo seco foi calculado como:  $RS(\%) = (mf/mi) \times 100$ , onde *mf* é a massa final da amostra em gramas e *mi* é a massa inicial da mesma, de forma que o resultado foi expresso em relação a 100 g de solução extrativa (Brasil, 2007).

##### 4.4.2 Cromatografia em camada delgada

A CCD foi realizada como descrito em 4.2.3.2, modificando-se a cromatoplaça para dimensão de 100 x 100 mm.

##### 4.4.3 Determinação de flavonoides totais

O conteúdo total de flavonoides foi determinado pelo método colorimétrico com cloreto de alumínio, descrito por Chang et al. (2002), com algumas modificações. À 0,5 mL da solução amostra solubilizada em metanol (EBRA: 800 µg/mL; demais extratos: 400 µg/mL) foram adicionados 1,5 mL de álcool de cereais, 0,1 mL de acetato de potássio 1 M (p/v), 0,2 mL de AlCl<sub>3</sub> a 10% (p/v), e 2,7 mL de água destilada. Após incubação à temperatura ambiente por 30 min, a absorvância da solução foi medida a 430 nm, utilizando o espectrômetro OceanOptics USB 2000+. A quantidade de AlCl<sub>3</sub> 10% foi substituída por água destilada no branco. A quercetina foi usada para a construção da curva de calibração,

em concentrações que variaram de 3,0 - 15,0 µg/mL. O conteúdo de flavonoides totais foi expresso em percentual, ou seja, gramas de flavonoides/100 g de extrato.

#### 4.4.4 Capacidade antioxidante

A capacidade sequestradora de radicais dos extratos foi avaliada por meio do método descrito por Amarowicz et al. (2004), o qual utiliza o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). Os extratos foram diluídos em 3 mL de metanol, de modo a atingir concentrações de 5,0 – 35,0 µg/mL para EBRAc e EBREAc; 50,0 – 140,0 µg/mL para o EBRA e 10,0 – 40,0 µg/mL para os demais extratos. A estas soluções foram acrescentados 375 µL de solução de DPPH (1 mmol/L). A mistura foi agitada em vortex por 15 s e deixada à temperatura ambiente durante 30 min. A absorvância foi medida em 517 nm no espectrômetro OceanOptics USB 2000+. Utilizou-se como branco uma solução metanólica de BHT (0,5 mg/mL) adicionada de 500 µL de solução de DPPH e como controle negativo, uma solução contendo 3 mL de metanol e 375 µL de solução de DPPH. Como controle positivo utilizou-se trolox em metanol nas concentrações de 5,0-12,0 µg/mL. A capacidade sequestradora de radical livre (CSR) foi determinada como %CSR, de acordo com a Equação 13. O valor de IC<sub>50</sub>, ou seja, a concentração do extrato necessária para inibir 50% do radical DPPH, foi obtida através da construção de uma curva com %CSR em função da concentração da amostra.

$$\%CSR = \frac{[AbsCN - AbsA] \times 100}{AbsCN} \quad \text{Eq. 13}$$

Onde:

AbsCN= absorvância do controle negativo

AbsA= absorvância do extrato

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos dados foram efetuadas usando o programa Statistica® 8.0 (StatSoft Copyright, Inc.) e Excel® (Microsoft Windows, 2010). Os resultados foram expressos em média ± DP [CV%].

Como o planejamento experimental de misturas empregado foi o simplex-centroide, utilizou-se o modelo cúbico especial para descrever a resposta da mistura ternária (Equação 14) (Barros Neto et al., 2003):

$$y = b_1^*x_1 + b_2^*x_2 + b_3^*x_3 + b_{12}^*x_1x_2 + b_{13}^*x_1x_3 + b_{23}^*x_2x_3 + b_{123}^*x_1x_2x_3 \quad \text{Eq. 14}$$

onde  $y$  é a resposta de interesse predita pelo modelo;  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$ ,  $b_{12}$ ,  $b_{13}$ ,  $b_{23}$ ,  $b_{123}$  são os parâmetros estimados, correspondentes aos componentes puros acetona ( $x_1$ ), etanol ( $x_2$ ) e água ( $x_3$ ) e suas interações binárias e ternária, preditos pelo modelo. Gráficos de superfície de resposta foram construídos.

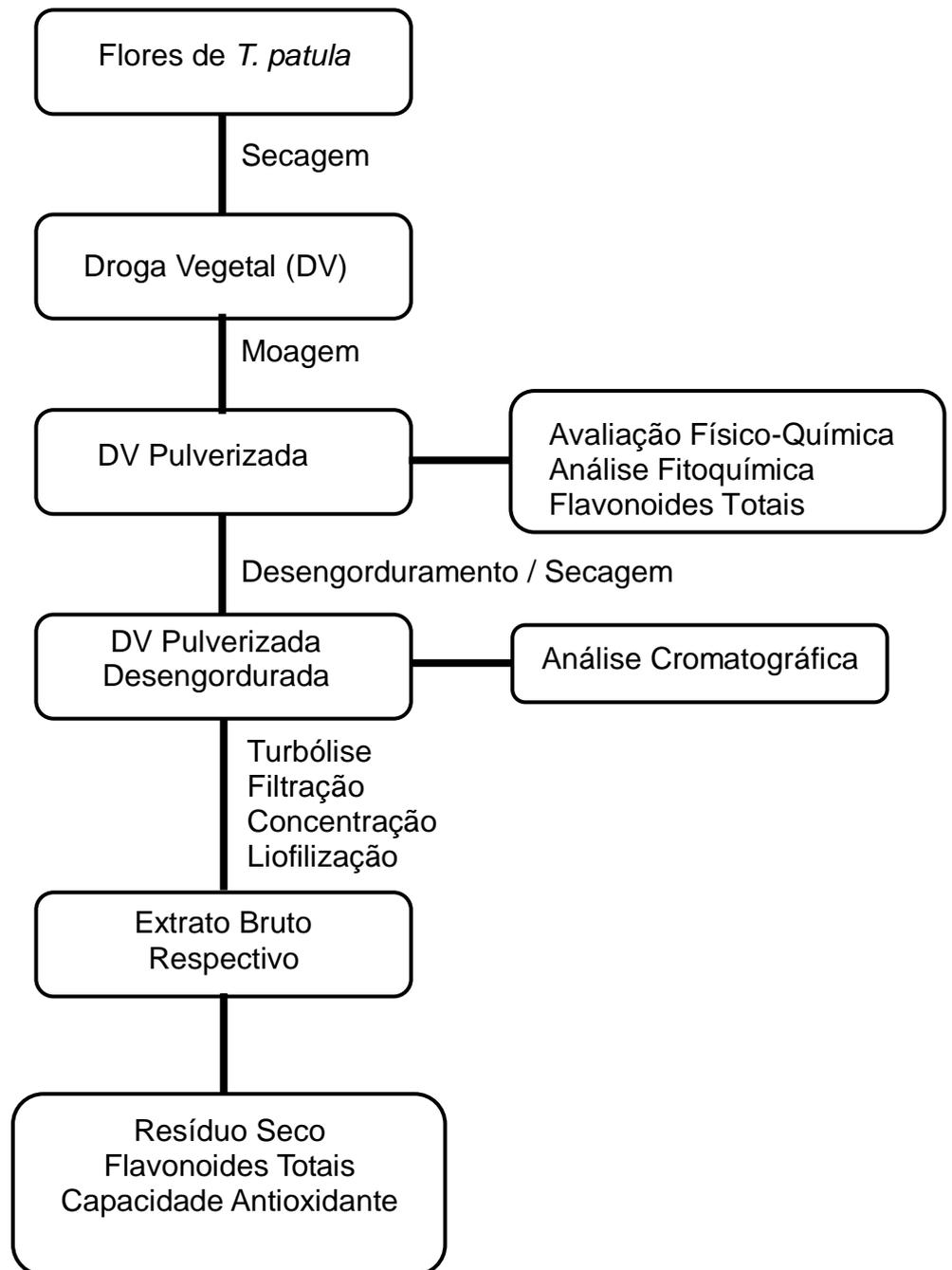


Figura 5 Fluxograma de todo o trabalho realizado, partindo das flores de *T. patula* até a obtenção e análise dos extratos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

*T. patula*, apesar de ser utilizada tradicionalmente para fins medicinais, e ser uma espécie amplamente estudada cientificamente, não possui critérios de qualidade estabelecidos.

Assim, os resultados obtidos neste estudo desempenham um papel significativo na definição de parâmetros de análise para a caracterização e identificação de flores de *T. patula*, além de contribuir para a obtenção de padrões de qualidade para a espécie vegetal. Os resultados da avaliação físico-química estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 Características físico-químicas de flores de *T. patula*.

| <b>Especificação</b>  | <b>(g / 100g DV) Média ± DP (CV%)</b> |
|-----------------------|---------------------------------------|
| Perda por dessecação  | 9,35±0,2 (2,10)                       |
| Teor de cinzas totais | 5,51±0,2 (3,61)                       |
| Teor de extrativos    | 39,55±0,52 (1,31)                     |

DV= droga vegetal; DP= desvio padrão; CV%= coeficiente de variação em porcentagem

O valor obtido no ensaio de perda por dessecação para *T. patula* foi inferior a 14% (Tabela 3), indicando que as operações preliminares empregadas no processamento pós-coleta (secagem e armazenamento) foram efetivas quanto à normalização do teor de umidade na droga vegetal.

A perda por dessecação, ensaio importante para a qualidade de drogas vegetais, refere-se ao teor de umidade e/ou substâncias voláteis presentes na espécie. O excesso de umidade em matérias-primas vegetais permite a ação de enzimas, com a possibilidade da degradação de constituintes químicos e desenvolvimento de fungos e bactérias, de maneira que o teor máximo de umidade estabelecido para drogas vegetais em diferentes farmacopeias varia entre 8 e 14%, com poucas exceções especificadas em monografias (Farias, 2003). Em estudo realizado por Gazim et al. (2007), com as flores de calêndula, os resultados encontrados foram 11,6% de umidade residual nas flores secas, valor indicado como adequado, pois a Farmacopeia Brasileira (2010) apresenta o limite de 12% para a espécie. Este compêndio também define limites do teor de umidade para as flores de cratogeomys, sabugueiro e sabugueiro do Brasil como 11, 11 e 10%, respectivamente. Assim, pode-se afirmar que valores característicos de perda por dessecação, além de informação

importante do ponto de vista tecnológico, serve também como parâmetro de qualidade para as flores de *T. patula*.

Na análise de cinzas totais o resultado pode ser observado na Tabela 3. Como não existem teores máximos para cinzas totais estabelecidos oficialmente para a espécie em estudo, este dado pode nortear futuras averiguações de cinzas totais na espécie.

A determinação do teor de cinzas totais de um vegetal constitui um ensaio de pureza para verificar quantitativamente impurezas inorgânicas não-voláteis por incineração, representando a soma de material inorgânico integrante da espécie (cinzas intrínsecas) com as substâncias aderentes de origem terrosa (cinzas extrínsecas) (Farmacopeia Brasileira, 2010). Isso significa que essa determinação é uma referência de qualidade e caracterização de um vegetal.

As flores de *T. patula* apresentaram um teor de extrativos, que pode ser utilizado como parâmetro para a avaliação de novos lotes da matéria-prima vegetal (Tabela 3).

A determinação do teor de extrativos é um ensaio utilizado para estimar o potencial de substâncias extraíveis da droga vegetal em água, como aminoácidos, açúcares, heterosídeos flavonoídicos e mucilagens. Esta característica individual pode ser considerada como um parâmetro importante na avaliação da qualidade da droga vegetal, pois está relacionada às características sazonais, ou seja, a produção de determinados grupos de metabólitos secundários, durante as estações do ano (Oliveira et al., 2001).

Os resultados obtidos na avaliação fitoquímica preliminar corroboraram com os dados da literatura sobre a presença de compostos fenólicos na espécie, entre eles flavonoides, fenólicos simples e taninos (Tabela 4). Foi observada uma maior intensidade nas reações para flavonoides. Essa intensidade pode ser devido à função desses constituintes em proteger os vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além de proteger contra insetos, fungos, vírus e bactérias (Zuanazzi & Montanha, 2007). As reações para os taninos foram menos acentuadas do que para os fenólicos simples, enquanto que a presença de alcaloide relatada por Faizi & Naz (2002) não foi observada.

Tabela 4 Análise fitoquímica preliminar das flores de *T. patula*

| <b>Classes</b>    | <b>Reação</b>                    | <b>Resultado</b> |
|-------------------|----------------------------------|------------------|
| Flavonoides       | Shinoda                          | +++              |
| Taninos           | Sais de alcaloide                | +                |
| Saponinas         | Formação e permanência de espuma | -                |
| Alcaloides        | Dragendorff                      | -                |
| Cumarinas         | Microsublimação                  | -                |
| Fenólicos Simples | AgNO <sub>3</sub> amoniacal      | +                |

+ : Presença do grupo químico caracterizada; - : Presença do grupo químico não caracterizada

Todas as identificações na CCD foram baseadas na comparação das distâncias de migração (valores de  $R_f$ ) e da cor das bandas entre a amostra e os padrões utilizados, antes e após a pulverização da placa com o agente cromogênico específico (Figura 6).

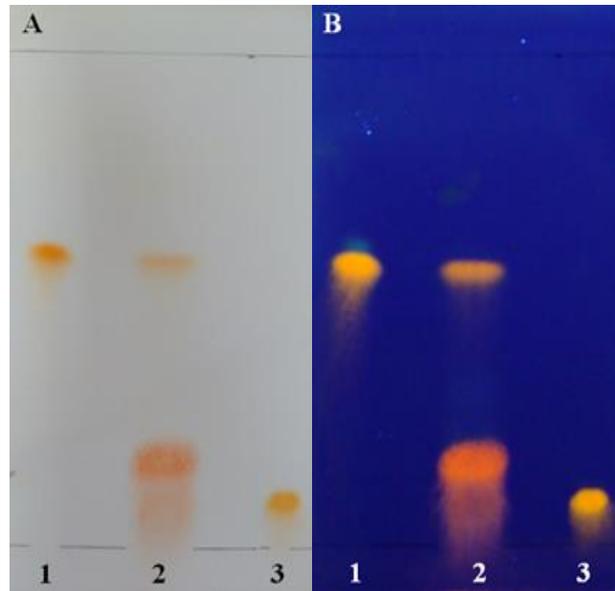


Figura 6 Cromatograma realizado após pulverização com agente cromogênico específico (reagente natural). (A) sob luz natural (B) sob luz UV à 365 nm. (1) quercetina; (2) EB; (3) rutina. Condições cromatográficas: gel de sílica F<sub>254</sub>; fase móvel: tolueno, acetato de etila, metanol e ácido fórmico (55:35:15:6; v/v).

A CCD é uma ferramenta que permite analisar a composição e a pureza do material estudado, auxiliando na identificação de problemas como a adulteração ou falsificação da espécie vegetal de interesse. É um método descrito em monografias de droga vegetais de vários códigos oficiais como ensaio de identificação e autenticidade. De acordo com o perfil cromatográfico obtido e correspondência com os valores de  $R_f$  dos padrões verifica-se que EB apresenta banda correspondente à quercetina ( $R_f = 0,58$ ), bem como uma segunda banda muito intensa com valor de  $R_f = 0,18$ . Assim, a metodologia desenvolvida na obtenção de um perfil cromatográfico por CCD para o EB de flores de *T. patula* possibilitou verificar a presença da quercetina na espécie.

Através do desenvolvimento de um sistema gradiente para a separação dos constituintes químicos do EB por CLAE (Figura 7), foi possível obter uma boa separação dos picos de interesse em 35 min. Por esse sistema foi possível determinar o tempo de retenção da quercetina (15,96 min) através dos dados espectroscópicos do padrão.

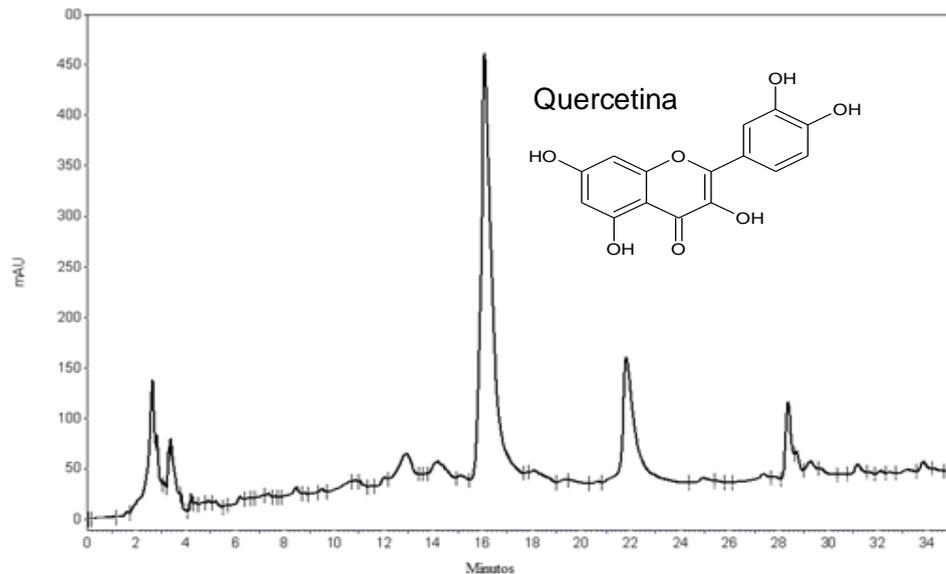


Figura 7 Perfil cromatográfico por CLAE do EB de flores de *T. patula*. Pico correspondente a quercetina em 15,96 min. Condições cromatográficas: pré-coluna (4 x 3 mm d.i., 5  $\mu$ m), C-18, coluna (250 x 4.6 mm d.i.; 5  $\mu$ m), Phenomenex® Gemini C-18; fase móvel: água (fase A) e acetonitrila (fase B); 0 min: 10% fase B; 5 min: 25% fase B; 10 min: 35% fase B; 15 min: 35% fase B; 25 min: 50% fase B; 28 min: 10% fase B; 35 min: 10% fase B.; vazão: 1,0 mL/min; detecção: 210 nm.

A presença de flavonoides em *T. patula* foi confirmada pela expressiva intensidade na reação de Shinoda e corroborada pelos dados de literatura sobre o isolamento desta classe de metabólitos secundários na espécie (Bhardwaj et al., 1980; Ivancheva & Zdravkova, 1993; Garg et al., 1999; Guinot et al., 2008; Faizi et al., 2011a).

Assim, optou-se pela determinação do teor de flavonoides na droga vegetal. O resultado do ensaio para a determinação de flavonoides totais foi de 5,24% $\pm$ 0,08 (1,51%), média muito superior ao encontrado para outras drogas vegetais da família Asteraceae. Mello & Petrovick (2000), assim como Borella & Fontoura (2002) determinaram o teor de flavonoides em *Baccharis trimera* (Less.) DC. (carqueja), de modo que os resultados variaram de 0,12 a 0,71% (p/p) para diferentes amostras. Segundo Piccaglia et al (1997) nas flores de *Calendula officinalis* L. (calêndula) o conteúdo deste metabólito variou de 0,25 a 0,75% (p/p), enquanto Oliveira et al (2001) obtiveram 1,70% (p/p) de flavonoides totais em flores de *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC. (marcela).

Devido ao teor de flavonoides, somado ao alto potencial terapêutico desta classe de metabólitos, avaliou-se, por meio do planejamento estatístico de misturas, o efeito dos solventes, água, etanol e acetona, assim como suas misturas, sobre a extração de flavonoides, com o objetivo de identificar o sistema mais adequado para a obtenção destes. Também foram avaliadas as respostas: resíduo seco e capacidade antioxidante de cada extrato produzido.

Quanto à caracterização dos extratos, todos os ensaios foram realizados, no mínimo, em triplicata. Os resultados estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 Resíduo seco, flavonoides totais e capacidade antioxidante dos diferentes extratos obtidos por planejamento simplex-centroide, com misturas de acetona, etanol e água.

| Extratos    | Resíduo Seco (%; p/p)<br>(CV%) | Flavonoides Totais<br>(%; p/p) (CV%) | Capacidade<br>Antioxidante<br>(IC <sub>50</sub> µg/mL) (CV%) |
|-------------|--------------------------------|--------------------------------------|--|
| 1 (EBRAc)   | 6,62 ± 1,33 (20,10)            | 25,13 ± 1,02 (4,07)                  | 15,74 ± 1,09 (6,92)  |
| 2 (EBRE)    | 32,22 ± 3,98 (12,37)           | 16,77 ± 0,77 (4,60)                  | 24,93 ± 1,68 (6,75)  |
| 3 (EBRA)    | 39,25 ± 3,89 (9,91)            | 4,64 ± 0,47 (10,08)                  | 114,76 ± 3,07 (2,67)   |
| 4 (EBREAc)  | 13,92 ± 2,90 (20,86)           | 23,44 ± 0,96 (4,12)                  | 17,77 ± 2,06 (11,57)   |
| 5 (EBRAAc)  | 41,57 ± 2,07 (4,98)            | 14,43 ± 1,28 (8,86)                  | 24,37 ± 2,49 (10,24)   |
| 6 (EBREA)   | 41,20 ± 3,68 (8,94)            | 13,19 ± 0,86 (6,55)                  | 25,46 ± 1,35 (5,29)  |
| 7 (EBREAAc) | 40,02 ± 2,62 (6,55)            | 12,94 ± 1,00 (7,76)                  | 21,87 ± 1,18 (5,38)  |
| Troxol      | -                              | -                                    | 8,03 ± 0,12 (1,53)   |

Resultados expressos como média ± DP (CV%), onde DP = desvio padrão; CV% = coeficiente de variação em percentagem

A determinação do resíduo seco foi utilizada para avaliar o poder extrativo do solvente em relação às flores de *T. patula*. O modelo cúbico especial mostrou-se apropriado, pois não exibiu falta de ajuste, apresentou satisfatório valor de coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,949$ ) e todos os coeficientes foram significativos em nível de 95% de confiança (Equação 15):

$$RS = 6,62x_1 + 32,22x_2 + 39,25x_3 - 22,00x_1x_2 + 74,52x_1x_3 + 21,84x_2x_3 + 154,69x_1x_2x_3$$

Eq. 15

O resíduo seco foi positivamente influenciado pelos efeitos lineares da água ( $x_3$ ) e etanol ( $x_2$ ), respectivamente. A acetona ( $x_1$ ) possui o menor coeficiente dentre os lineares, o que pode ser observado também na Tabela 5, apresentando o menor resíduo seco (6,62%± 1,33 (20,10%)). Dentre as interações binárias, a presença da acetona reduziu o poder extrator do etanol ( $x_1x_2$ ), sendo que o mesmo não ocorreu com a água ( $x_1x_3$ ) e na interação ternária ( $x_1x_2x_3$ ), pois esta demonstrou efeito sinérgico entre os componentes da mistura.

Os extratos produzidos com misturas que continham água em sua composição apresentaram os maiores valores de resíduo seco o qual variou de 39,25%±3,89 (9,91%) a 41,57%±2,07 (4,98%) (Figuras 8 e 9), sendo que de acordo com o teste de Tukey não houve diferença significativa entre as médias destes.

Os resultados indicam que a extração é afetada pela polaridade dos solventes. A pré-lavagem das flores com *n*-hexano reduziu em torno de 14% a massa de droga vegetal

seca. Em trabalho realizado por Faizi et al (2011b), 63 substâncias foram identificadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas em frações não polares de flores de *T. patula*, com o predomínio de longas cadeias de ácidos graxos, hidrocarbonetos e tiofenos encontrados na fração éter de petróleo. Assim, este fato possivelmente pode explicar a menor eficiência da acetona (P=5,1) e etanol (P=4,3), que possivelmente ocorreu em função de parte dos compostos de média polaridade, ter sido inicialmente extraída com *n*-hexano, e o efeito positivo predominante da água (P=10,2) e suas misturas, devido à presença de substâncias hidrofílicas como os aminoácidos, açúcares, heterosídeos flavonoídicos e mucilagens, por exemplo.

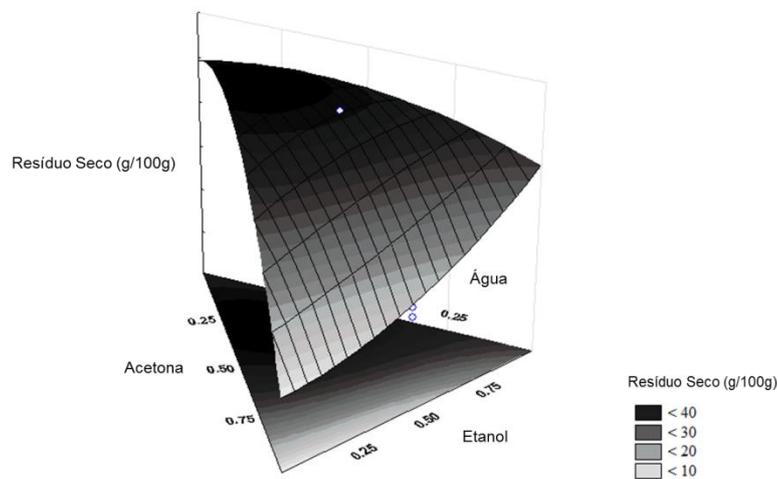


Figura 8 Superfície de resposta do resíduo seco para os sete extratos produzidos de acordo com o simplex-centroide composto por acetona, etanol e água.

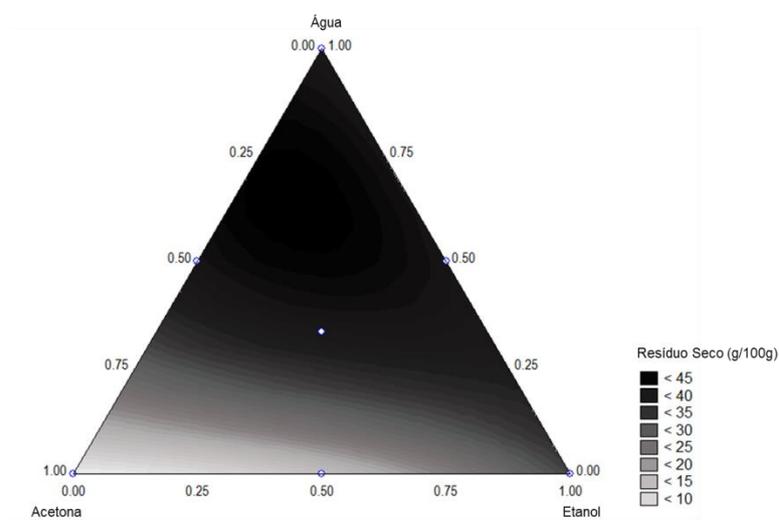


Figura 9 Curvas de nível do resíduo seco para os sete extratos produzidos de acordo com o simplex-centroide composto por acetona, etanol e água.

A partir dos resultados de resíduo seco obtidos, o programa Statistica® forneceu quais as proporções de cada um dos solventes para alcançar valores ótimos desta resposta. Através da Figura 10, observa-se que seria desejável a mistura ternária acetona:etanol:água (25:15:60 v/v/v).

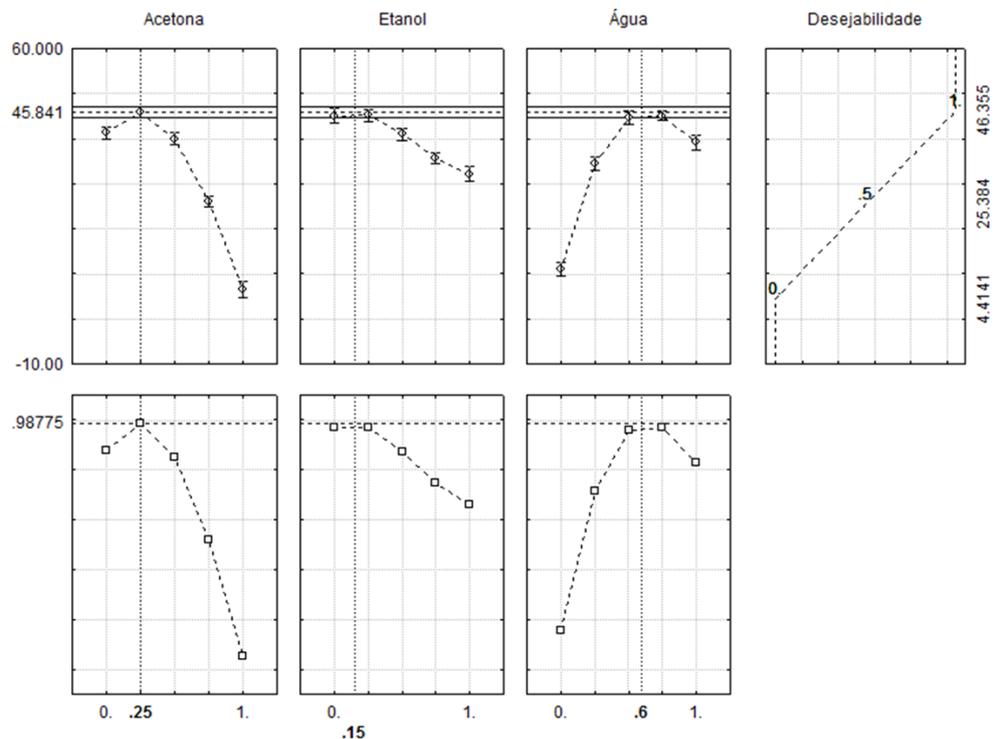


Figura 10 Desejabilidade calculada no Statistica® para obter valores ótimos de resíduo seco.

A curva de calibração para a quantificação dos flavonoides nos extratos foi construída utilizando-se a quercetina como padrão. Seu uso se justifica, pois este flavonol foi detectado em todos os extratos por meio da cromatografia em camada delgada (Figura 11), e na caracterização da droga vegetal através de cromatografia líquida de alta eficiência, a quercetina mostrou-se como pico majoritário (Figura 7).

Foram construídas três curvas de calibração de quercetina, em três dias diferentes, com duplicata em cada concentração, com posterior união destas resultando em uma única curva de calibração (Figura 12). De acordo com o coeficiente de correlação obtido ( $R^2=0,9944$ ) a curva apresenta relação linear entre a concentração e a absorvância, sendo que o critério mínimo aceitável, segundo RE nº 899 de 29 de maio de 2003, é de 0,99, para a análise de no mínimo cinco concentrações diferentes (Brasil, 2003). Para avaliar a adequação do método e a significância estatística do modelo linear, duas condições precisam ser satisfeitas: a 'soma do erro puro' deve ser maior que o 'erro por falta de ajuste' e, o 'quadrado médio do erro por falta de ajuste' dividido pelo 'quadrado médio do erro puro'

deve ser menor que o valor tabelado na distribuição “F” para determinado grau de liberdade. Os valores obtidos na análise de resíduo no teste de linearidade para ‘soma do erro puro’, ‘erro por falta de ajuste’, ‘quadrado médio do erro por falta’, ‘quadrado médio do erro puro’ foram, respectivamente, 0,0076; 0,0014; 0,0003 e 0,00024. Sendo o “F tabelado” para esses dados 4,13, o método satisfaz as condições estatísticas, demonstrando que o modelo linear não apresenta erro por falta de ajuste. Além disso, a análise de variância demonstra que a regressão é significativa ( $F_{1,37}=6597,87$ ,  $p<0,001$ ).

Para o doseamento dos flavonoides optou-se por um método sem hidrólise para reduzir possíveis erros provenientes da extração das agliconas após a hidrólise ácida.

De acordo com Bisinoti & Jardim (2004), para o sucesso da análise química, além da escolha da técnica analítica, o preparo da amostra é um fator de extrema importância, sendo responsável pelas maiores fontes de erro como perdas do analito, extração incompleta do analito da amostra, entre outras.

A escolha do método de preparo da amostra assim como do equipamento a ser utilizado para o doseamento depende de fatores como: disponibilidade, capacidade total do método, tempo de análise, facilidade de recuperação, custos envolvidos, entre outros (Bisinoti & Jardim, 2004).

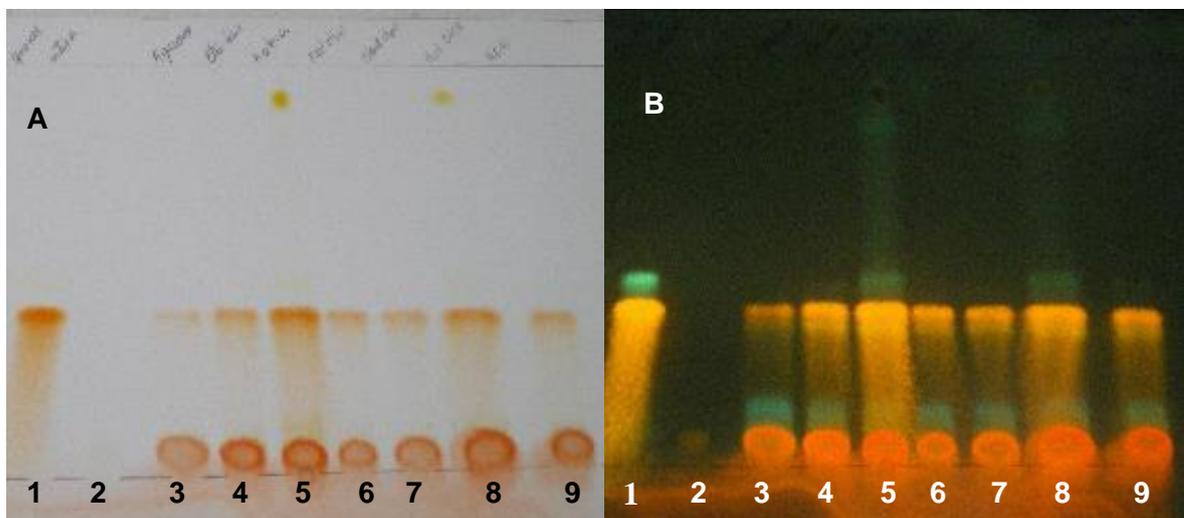


Figura 11 Cromatograma realizado após pulverização com agente cromogênico específico (reagente natural). (A) sob luz natural (B) sob luz UV à 365 nm. (1) quercetina; (2) rutina; (3) EBRA; (4) EBRE; (5) EBRAC; (6) EBRAAC; (7) EBREA; (8) EBREAC; (9) EBRAEAC. Condições cromatográficas: gel de sílica F<sub>254</sub>; fase móvel: tolueno, acetato de etila, metanol e ácido fórmico (55:35:15:6; v/v).

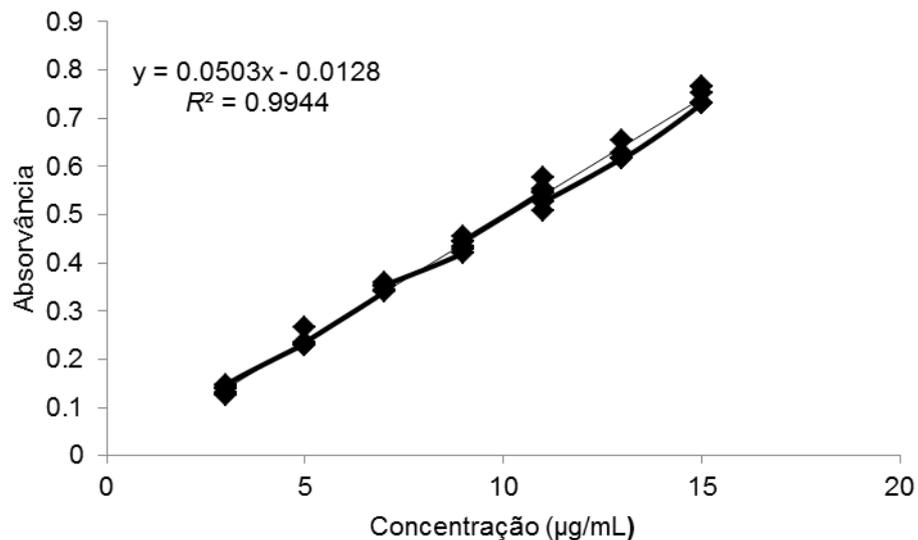


Figura 12 Curva analítica da absorvância da solução padrão de quercetina em diferentes concentrações.

O conteúdo de flavonoides totais (CFT) variou de  $4,64\% \pm 0,47$  (10,08%) a  $25,13\% \pm 1,02$  (4,07%) de acordo com a Tabela 5. Ao contrário dos resultados de resíduo seco, o EBRAC apresentou maior CFT,  $25,13\% \pm 1,02$  (4,07), que pode ser confirmado através da Equação 16 obtida pelo modelo cúbico especial ( $R^2 = 0,979$ ; sem falta de ajuste), na qual a acetona ( $x_1$ ) apresenta importante efeito para a resposta avaliada, tanto pura quanto combinada com o etanol ( $x_1x_2$ ). A acetona ( $x_1$ ) como efeito linear mostrou-se positiva, enquanto a água ( $x_3$ ) exerceu menor influência, obtendo-se CFT de apenas  $4,64\% \pm 0,47$  (10,08%). A presença da água na mistura ternária ( $x_1x_2x_3$ ) ocasionou uma queda na capacidade extrativa quando comparado aos solventes puros, acetona ( $x_1$ ) e etanol ( $x_2$ ), demonstrado pelo coeficiente negativo e CFT de  $12,94\% \pm 1,00$  (7,76%). A interação binária ( $x_1x_3$ ) não foi significativa ( $p > 0,05$ ).

$$\text{TFC} = 24,98x_1 + 16,77x_2 + 4,46x_3 + 10,26x_1x_2 + 10,31x_2x_3 - 128,15x_1x_2x_3 \quad \text{Eq. 16}$$

A purificação com *n*-hexano resultou na seletividade do solvente em relação aos flavonoides, principalmente no caso da acetona. Isto indica que a acetona é o solvente mais apropriado para extrair esses compostos da planta em estudo, possivelmente pelo predomínio de agliconas livres e/ou metoxiladas na droga vegetal desengordurada, como canferol, quercetina (Ivancheva & Zdravkova, 1993), patuletina (Bhardwaj et al., 1980; Garg et al., 1999; Guinot et al., 2008), quercetagetina, luteolina e quercetagetina 5-metil-éter (Bhardwaj et al., 1980), descritos para a espécie, os quais apresentam reduzida

hidrossolubilidade (Zuanazzi & Montanha, 2007), o que talvez possa explicar o baixo valor de CFT no extrato aquoso.

Malwade et al (2013) avaliaram a solubilidade da quercetina em solventes como acetona e etanol, na temperatura ambiente. Os resultados demonstraram resultados de 67 mg de quercetina / mL de acetona e 13 mg de quercetina / mL de etanol. Rupasinghe et al (2011) pesquisaram o efeito da polaridade dos solventes água, metanol, acetona, acetato de etila e cloroformio na extração de quercetina de cascas desidratadas de maçã, sendo que os únicos solventes extratores para esta substância foram metanol seguido de acetona, possivelmente pelos valores próximos de polaridade.

De acordo com a literatura, a utilização da água como solvente não é eficiente para extrair compostos fenólicos, pois estes são geralmente mais solúveis em solventes orgânicos menos polares do que em água (Kim & Lee, 2002). Sendo assim, diversos estudos relatam o aumento na eficiência extrativa destes metabólitos, inclusive os flavonoides, através da mistura de água e solventes orgânicos, como acetona, metanol e etanol, de maneira que o uso destes solventes puros também reduz o poder extrator (Wijekoon et al, 2011; Gong et al, 2012; Meneses et al, 2013). Observa-se nas Figuras 13 e 14, que a adição de etanol ou acetona à água levou ao aumento de CFT, porém, a acetona pura obteve o melhor resultado, como já demonstrado na Tabela 5.

Desta forma, na Figura 15 observa-se que os valores ótimos de conteúdo de flavonoides seriam obtidos utilizando-se somente acetona ou a mistura acetona:etanol (87,5:12,5 v/v).

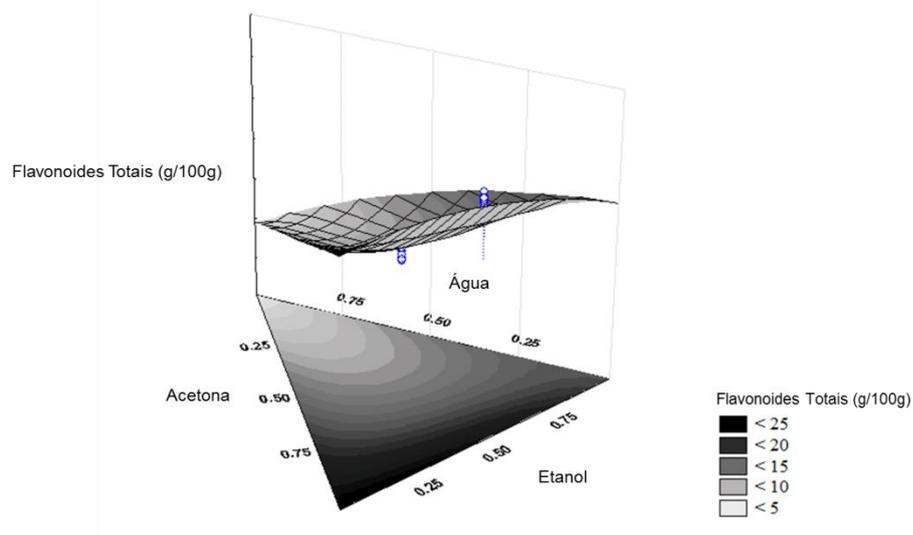


Figura 13 Superfície de resposta do conteúdo de flavonoides totais para os sete extratos produzidos de acordo com o simplex-centroide composto por acetona, etanol e água.

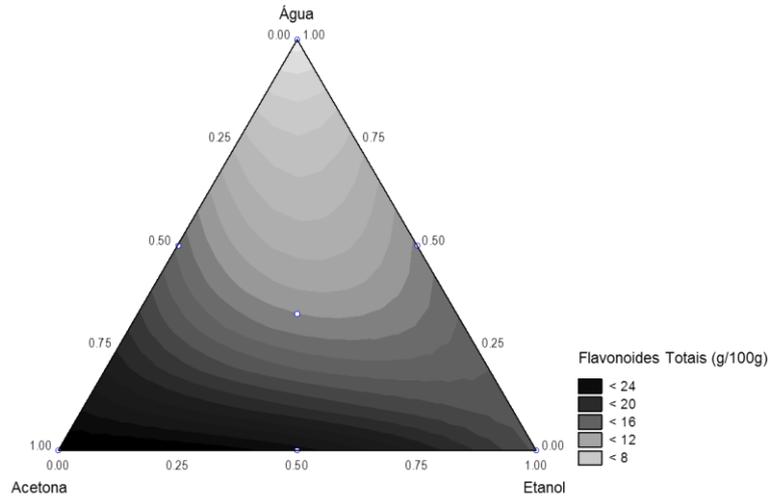


Figura 14 Curvas de nível do conteúdo de flavonoides totais para os sete extratos produzidos de acordo com o simplex-centroide composto por acetona, etanol e água.

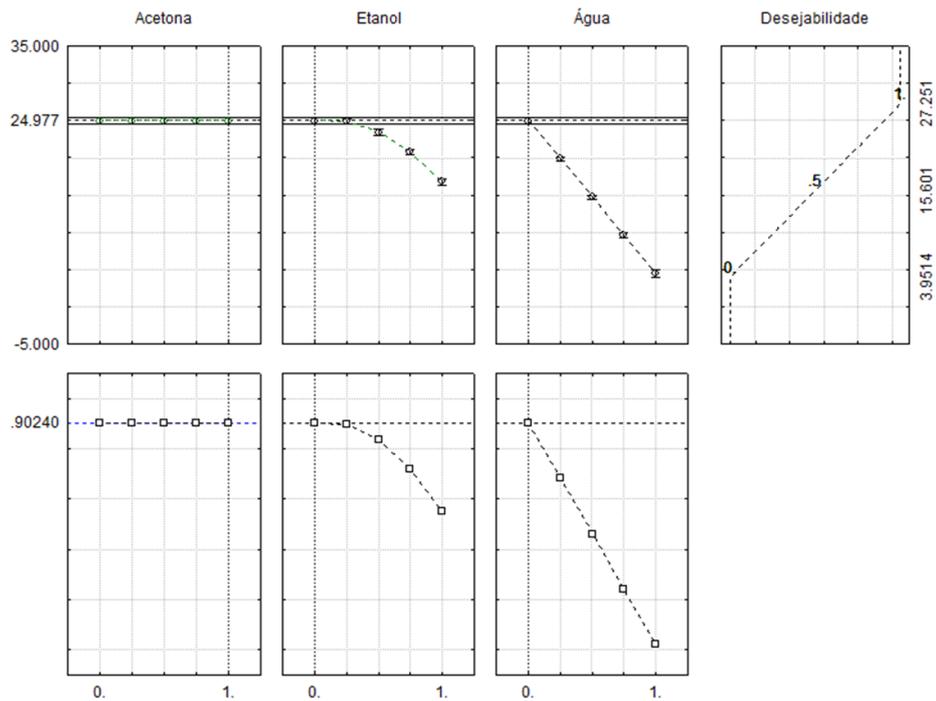


Figura 15 Desejabilidade calculada no Statistica® para obter valores ótimos de conteúdo de flavonoides totais.

Na avaliação da capacidade antioxidante dos extratos, em geral, observou-se comportamento semelhante ao obtido no doseamento de flavonoides. Os resultados, descritos na Tabela 5, estão expressos como  $IC_{50}$ , ou seja, a concentração de extrato necessária para inibir 50% do radical DPPH. O EBRAc apresentou o menor  $IC_{50}$ , ao contrário do EBRA. Na Equação 17 (modelo cúbico especial;  $R^2 = 0,997$ ; sem falta de

ajuste), dentre os efeitos lineares, a água ( $x_3$ ) mostrou importante efeito negativo sob a extração de compostos com capacidade antioxidante, mas quando combinada com acetona ( $x_1x_3$ ) ou etanol ( $x_2x_3$ ) houve o aumento na extração destas substâncias. Isto pode ser observado nas Figuras 16 e 17, as quais demonstram que os menores valores de  $IC_{50}$  foram alcançados utilizando-se a acetona e suas misturas binárias, além da mistura etanol:água (75:25 v/v).

$$CA = 15,74x_1 + 24,93x_2 + 114,76x_3 - 10,25x_1x_2 - 163,53x_1x_3 - 177,55x_2x_3 + 245,54x_1x_2x_3$$

Eq.17

As substâncias fenólicas presentes nas plantas são conhecidos por sua capacidade antioxidante (Skerget et al, 2005). Os flavonoides possuem essa capacidade devido, principalmente as suas hidroxilas doarem um elétron para os radicais como hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ), superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e peroxila ( $ROO^{\bullet}$ ), neutralizando-os desta forma (Cao et al., 1997). Estudos prévios demonstraram que as propriedades antioxidantes de plantas estão altamente correlacionadas com o conteúdo de substâncias fenólicas totais e flavonoides (Gong et al, 2012; Meneses et al, 2013).

A Figura 18 demonstra que valores ótimos de capacidade antioxidante, ou seja, baixos valores de  $IC_{50}$ , seriam obtidos utilizando como solvente a acetona ou a mistura etanol:água (75:25 v/v).

A análise de correlação entre a porcentagem de inibição do DPPH obtida para os extratos e o conteúdo de flavonoides destes revelaram uma correlação positiva entre ambos,  $R^2 = 0,7387$  (Figura 19), o que significa que os flavonoides contribuem significativamente para a capacidade antioxidante dos extratos analisados, principalmente aqueles preparados com acetona e a mistura acetona:etanol (1/1 v/v). Porém, os extratos derivados de misturas binárias contendo água também apresentaram interessante capacidade redutora do radical DPPH, possivelmente devido a presença, além dos flavonoides, de outros compostos tais como: ácidos gálico, clorogênico, cafeico, vanílico, siríngico, *p*-cumárico, ferúlico, sinápico e benzóico, encontrados em espécies de *Tagetes* (Faizi et al, 2011b; Kaisoon et al., 2012).

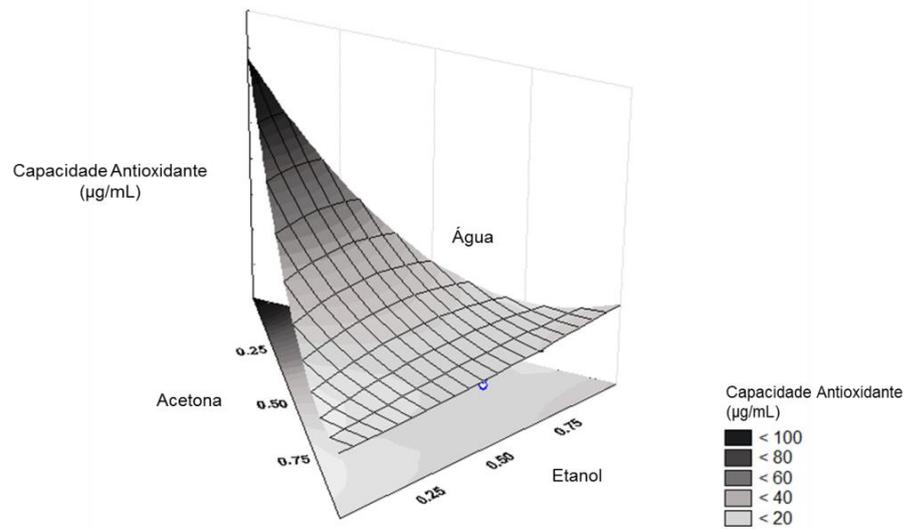


Figura 16 Superfície de resposta da capacidade antioxidante dos sete extratos produzidos de acordo com o simplex-centroide composto por acetona, etanol e água.

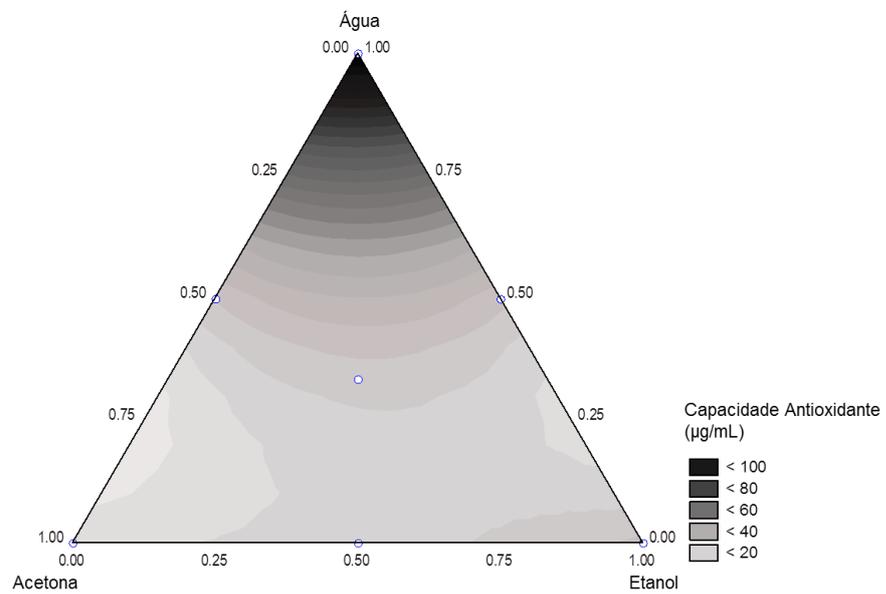


Figura 17 Curvas de nível da capacidade antioxidante dos sete extratos produzidos de acordo com o simplex-centroide composto por acetona, etanol e água.

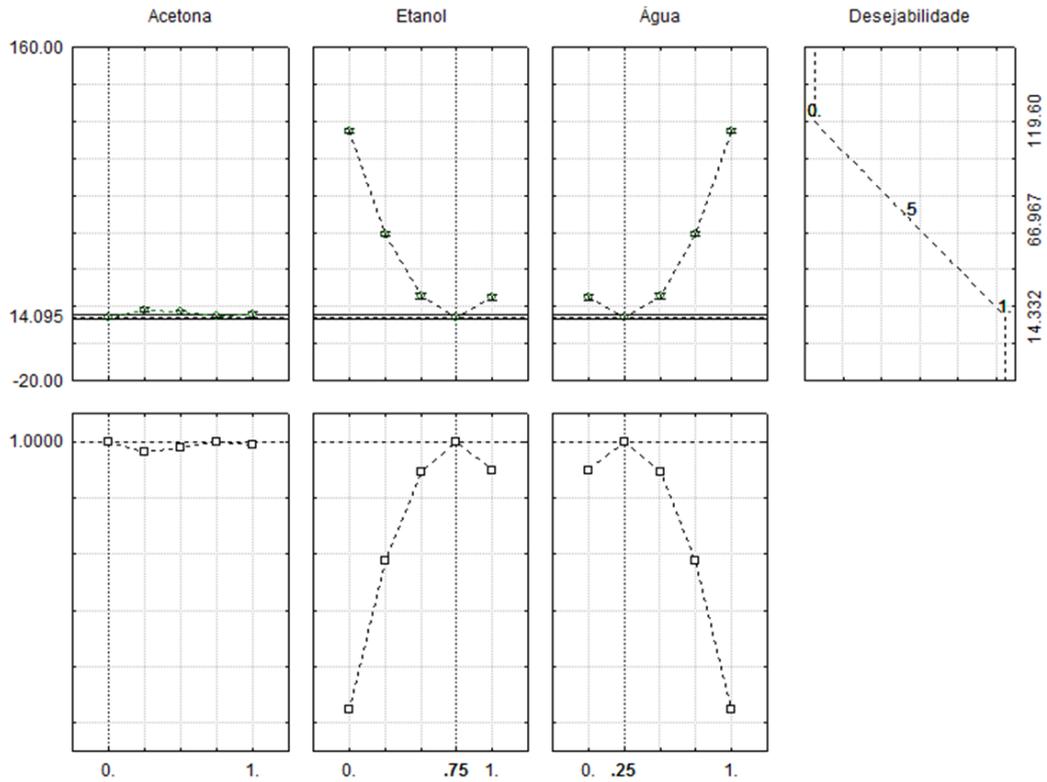


Figura 18 Desejabilidade calculada pelo Statistica® para obter extratos com ótima capacidade antioxidante.

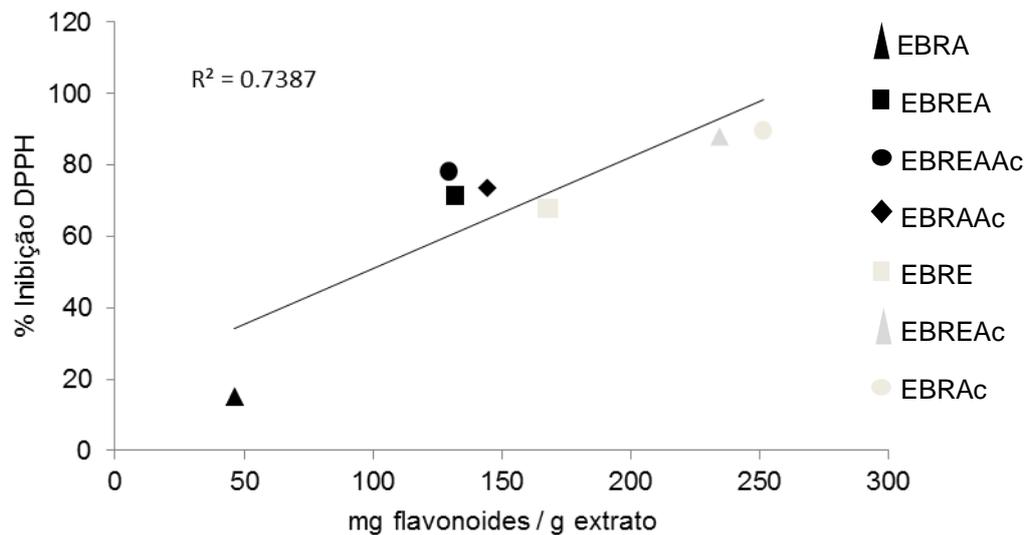


Figura 19 Correlação (análise de regressão simples) entre a capacidade antioxidante através da porcentagem de inibição do radical DPPH, e o conteúdo de flavonoides dos sete extratos produzidos por simplex-centroide, composto por acetona, etanol e água.

O planejamento de misturas do tipo simplex-centroide mostrou-se uma ferramenta objetiva e acessível devido a sua simplicidade e praticidade na elaboração dos experimentos e modelos matemáticos gerados referentes aos resultados para determinada resposta, que aliados à análise de superfície de resposta, nos fornece o melhor sistema de misturas para a propriedade de interesse.

Este trabalho, somado a outros que foram e estão sendo desenvolvidos no laboratório PALAFITO demonstram que o planejamento estatístico de misturas pode ser aplicado no estudo de produtos naturais, contribuindo para a otimização dos processos extrativos.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo contribuem na caracterização e identificação das flores de *T. patula* a fim de obter parâmetros para avaliação da qualidade da espécie.

Quanto ao planejamento experimental de misturas, este possibilitou a otimização da extração de flavonoides das flores desengorduradas de *T. patula*, demonstrando o solvente acetona como o melhor líquido extrator. Apesar de apresentar o menor valor de resíduo seco, a acetona mostrou-se seletiva para os flavonoides presentes na droga vegetal em estudo.

Quanto à capacidade antioxidante, os resultados sugerem que os flavonoides estão correlacionados com esta atividade, já que o extrato com o maior conteúdo de flavonoides totais (EBRAc) também apresentou o menor valor de IC<sub>50</sub>.

Porém, este trabalho representa apenas o início para a padronização destes critérios, pois para isto é necessário analisar diferentes lotes da espécie cultivadas em diversas localidades.

## REFERÊNCIAS

- Abdala LR 2001. *Tagetes tenuifolia* Cav. (Asteraceae): some chemosystematic implications of their flavonoids. *Biochem Syst Ecol* 29: 861-863.
- Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil JA 2004. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem* 84: 551-562.
- Andreotti R, Garcia MV, Cunha RC, Barros JC 2013. Protective action of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil in the control of *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in a cattle pen trial. *Vet Parasitol* (artigo aceito para publicação).
- Arnason JTB, Philogène JR, Morand P, Imrie K, Iyengar S, Duval F, Soucy-Breau C, Scaiano JC, Werstiuk NH, Hasspieler B, Downe AER 1989. Naturally occurring and synthetic thiophenes as photoactivated insecticides. *ACS Sym Ser* 387: 164-172.
- Bano H, Ahmed SW, Azhar I, Ali MS, Alam N 2002. Chemical constituents of *Tagetes patula* L. *Pak J Pharm Sci* 15 (2): 1-12.
- Barata L 2005. Empirismo e ciência: fonte de novos fitomedicamentos. *Cien. Cult.* 57: 4-5.
- Barros Neto B, Scarminio IS, Bruns RE 2003. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. Campinas: UNICAMP.
- Batish DR, Arora K, Singh H, Kohli RK 2007. Potential utilization of dried powder of *Tagetes minuta* as a natural herbicida for managing rice weeds. *Crop Prot* 26: 566-571.
- Beretta ME, Fernandes AC, Schneider AA, Ritter MR 2008. A família Asteraceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. *R Bras Bioci* 6(3): 189-216.
- Bhardwaj DK, Bisht MS, Uain SC, Metha CK, Sharma GC 1980. Quercetagenin 5-methyl ether from the petal of *Tagetes patula*. *Phytochemistry* 19: 713-714.
- Bisinoti MC, Jardim WF 2004. *Caderno Temático: o emprego de técnicas analíticas na especiação de metais pesados e a sua importância para o estudo do ambiente*. Campinas: UNICAMP.
- Borella JC, Fontoura A. 2002. Avaliação do perfil cromatográfico e do teor de flavonóides em amostras de *Baccharis trimera* (Less) DC., Asteraceae (carqueja) comercializadas em Ribeirão Preto, SP, Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 12: 63-67.
- Braga AF 2000. *Otimização de metodologias de extração de ácidos húmicos de solos e de húmus*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.
- Brandão MGL, Cosenza GP, Moreira RA, Monte-Mor RLM 2006. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev Bras Farmacogn* 16: 408-420.
- Brasil 2003. Resolução (RE) nº 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.
- Brasil 2006. *Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos*. Brasília: Ministério da Saúde (Série B. Textos Básicos de Saúde).
- Brasil 2007. *Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos*. Brasília: ANVISA.
- Brasil 2012. Portaria Nº 533 de 28 de março de 2012. Estabelece o elenco de medicamentos e insumos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Brasília: Ministério da Saúde.
- Bremer K 1994. *Asteraceae: Cladistics and Classification*. Portland: Timber Press.
- Campos LFA, Amorim LV, Ferreira HC 2006. Utilização do planejamento experimental no estudo do efeito da composição de misturas de bentonitas na reologia de fluidos de perfuração. Parte I: composições binárias. *Cerâmica* 52: 69-75.
- Cao G, Sofic E, Prior RL 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 22: 749-760.
- Capelari-Oliveira P, Paula CA, Rezende SA, Campos FT, Grabe-Guimarães A, Lombardi JA, Saúde-Guimarães DA 2011. Anti-inflammatory activity of *Lychnophora passerina*, Asteraceae (Brazilian "Arnica"). *J Ethnopharmacol* 135: 393-398.

- Cestari IM, Sarti SJ, Waib CM, Branco-Junior AC 2004. Evaluation of the potential insecticide activity of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil against the head lice *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). *Neotrop Entomol* 33 (6): 805-807.
- Chadha YR, 1976. *Tagetes* Linn (Compositae). *The Wealth of India*. 10: 109-112.
- Chan GFQ, Prihoda M, Towers GHN, Mitchell, JC 1977. Phototoxicity evoked by alpha-terthienyl. *Contact Dermatitis* 3: 215-216.
- Chan GFQ, Towers GHN, Mitchell JC 1975. Ultraviolet-mediated antibiotic activity of thiophene compounds of *Tagetes*. *Phytochemistry* 14: 2295-2296
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* 10 (3): 178-182.
- Cork NNA, Boomathi N, Pandi R, Velanan S, Dhakshnamoorthy G 2006. Cold aqueous extracts of african marigold, *Tagetes erecta* for control tomato root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Crop Prot* 25: 1210-1213.
- Cornell JA 1990. *Experiments with mixtures: designs, models and the analysis of mixtures data*. New York: Wiley.
- Coscione AR, Andrade JC, May GM 2005. O modelamento estatístico de misturas: experimento tutorial usando voltametria de redissolução anódica. *Quim. Nova* 28 (6): 1116-1122.
- Deutsches Arzneibuch 1986. Stuttgart: Wissenschaftliche.
- Dharmagadda VSS, Naik SN, Mittal PK, Vasudevan P 2005. Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. *Bioresource Technol* 96: 1235-1240.
- EC 1995 Commission Directive 95/45/EC of 26 July 1995 laying down specific purity criteria concerning colours for use in foodstuffs. OJ L 226, 22.9.2995, p.1
- Emerenciano VP, Militão JSLT, Campos CC, Romofe P, Kaplan MAC, Zambon M, Brant AJC 2001. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. *Biochem Syst Ecol* 29 (9): 947.
- Faizi S, Naz A 2002. Jafrine, a novel and labile  $\beta$ -carboline alkaloid from the flowers of *Tagetes patula*. *Tetrahedron* 58: 6185-6197.
- Faizi S, Siddiqi H, Bano S, Naz A, Mazhar K, Nasim S, Riaz T, Kamal S, Ahmad A, Khan AS 2008. Antibacterial and antifungal activities of different parts of *Tagetes patula*: preparation of patuletin derivatives. *Pharm Biol* 46: 309-320.
- Faizi S, Dar A, Siddiqi H, Naqvi S, Naz A, Bano S, Lubna 2011a. Bioassay-guided isolation of antioxidant agents with analgesic properties from flowers of *Tagetes patula*. *Pharm Biol* 49: 516-525.
- Faizi S, Fayyaz S, Bano S, Iqbal EY, Lubna, Siddiqi H, Naz A 2011b. Isolation of nematicidal compounds from *Tagetes patula* L. yellow flowers: structure-activity relationship studies against cyst nematode *Heterodera zea infective* stage larvae. *J Agr Food Chem* 59: 9080-9093.
- Farias MR 2003 - Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (org.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p. 263-288.
- Farmacopeia Brasileira 2010. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, v 1,2.
- Fischer DCH 2005. Controle de qualidade de matérias-primas vegetais e produtos fitoterápicos. In: Gil ES, Orlando RM, Matias R, Serrano SHP. *Controle físico-químico de qualidade de medicamentos*. Campo Grande: Editora Uniderp.
- Garcia LMZ, Oliveira TF, Soares PK, Bruns RE, Scarminio, IS 2010. Statistical mixture design – Principal component determination of synergic solvent interactions for natural product extractions. *Chemometr Intell Lab* 103: 1-7.
- Garg SN, Charles R, Kumar S 1999. A new acyclic monoterpene glucoside from the capitula of *Tagetes patula*. *Fitoterapia* 70: 472-474.
- Gazim ZC, Ferreira GA, Rezende CM, Nakamura CV, Dias Filho BP, Cortez DAG 2007. Identificação dos constituintes químicos da fração volátil da *Calendula officinalis* produzida no Paraná. *Horticultura Brasileira* 25: 118-121.

- Giri RK, Bosc A, Mishra SK 2011. Hepatoprotective activity of *Tagetes erecta* against carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats. *Acta Pol Pharm* 68 (6): 999-1003.
- Gommers FJ, Bakker J 1988. Mode of action of alpha-terthieyl and related compounds may explain the expressant effects of *Tagetes* species on populations of free living endoparasitic plant nematodes. *Bioact Mol* 7: 61–69.
- Gong Y, Liu X, He WH, Xu HG, Yuan F, Gao YX 2012. Investigation into the antioxidant activity and chemical composition of alcoholic extracts from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue. *Fitoterapia* 83: 481-489.
- Guadarrama-Cruz G, Arlacon-Aguilar FJ, Lezama-Velasco R, Vazquez-Palacios G, Bonilla-Jaime H 2008. Antidepressant like effects of *Tagetes lucida* Cav. in the forced swimming test. *J Ethnopharmacology* 120: 277-281.
- Guinot P, Gargadennec A, Valette G, Fruchier A, Andary C 2008. Primary flavonoids in marigold dye: extraction, structure and involvement in the dyeing process. *Phytochem. Anal.* 19: 46-51.
- Harborne, JB 1998. *Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. London: Chapman and Hall.
- Hassanpouraghdam MP, Shekari F, Emarai-Pardaz J, Shalamzari MS 2011. Sesquiterpene rich volatile seed oil of *Tagetes patula* L. from northwest Iran. *J Cent Eur Agr* 12 (2): 304-311.
- Heywood, VH 1993. *Flowering plants of the world*. New York: Oxford University Press.
- Hudson JB, Graham EA, Chan GC, Finlayson AJ, Towers GHN 1986. Comparison of the antiviral effects of naturally occurring thiophenes and polyacetylenes. *Planta Med* 6: 453–458.
- Ibrahim M, Kiranmai M 2012. Antibacterial potential of different extracts of *Tagetes erecta* Linn. *Int J Pharm* 2 (1): 90-96.
- Ivancheva S, Zdravkova M 1993. Flavonoids in *Tagetes patula*. *Fitoterapia* 64: 555:558.
- Kaisoon O, Konczak I, Siriamornpun S, 2012. Potential health enhancing properties of edible flowers from Thailand. *Food Res Int* 46: 563-571.
- Kasahara Y, Yasukawa K, Kitanaka S, Khan TM, Evans FJ 2002. Effect of methanol extract from flower petals of *Tagetes patula* L. on acute and chronic inflammation model. *Phytother Res* 16: 217-222.
- Kim DO, Lee CY 2002. Extraction and isolation of polyphenolics. In: Wrolstad RE. (ed) *Current protocols in food analytical chemistry*. New York: John Wiley & Son, 11.2.1 – 11.2.12.
- Li X, Zhang S, Yang Z, Song K, Yi T 2013. Conservation genetics and population diversity of *Erigeron breviscapus* (Asteraceae), an important chinese herb. *Biochem Syst Ecol* 49: 156-166.
- Lonni AASG, Longhini R, Lopes GC, Mello JCP, Scarminio IS 2012. Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*. *Anal Chim Acta* 719: 57-60.
- López SB, López ML, Aragón LM, Tereschuk ML, Slanis AC, Feresin GE, Zygadlo JA, Tapia AA 2011. Composition and anti-insect activity of essential oils from *Tagetes* L. species (Asteraceae, Heleniae) on *Ceratitis capitata* Wiedemann and *Triatoma infestans* Klug. *J Agric Food Chem* 59: 5286-5292.
- Lorenzi H, Souza, HM 1995. *Plantas ornamentais no Brasil. Arbustivas, herbáceas e trepadeiras*. São Paulo: Plantarum.
- Lucca PSR, Eckert RG, Smanhotto V, Kuhn LM, Minanti LR 2010. Avaliação farmacognóstica e microbiológica da droga vegetal camomila (*Chamomilla recutita* L.) comercializada como alimento em Cascavel – Paraná. *Rev Bras Pl Med* 12 (2): 153-156.
- Macêdo ME, Consoli RAGB, Grandi ISM, Anjos AMG, Oliveira AB, Mendes NM, Queiróz RO, Zani CL 1997. Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera Culicidae). *Men Inst Oswaldo Cruz* 92(4): 565-570.

- Mali S, Debiagi F, Grossmann MVE, Yamashita F 2010. Starch, sugarcane bagasse fibre, and polyvinyl alcohol effects on extruded foam properties: A mixture design approach. *Ind. Crop Prod* 32: 353-359.
- Malwade CR, Qu H, Rong BG, Christensen LP 2013. Purification of artemisinin from quercetin by anti-solvent crystallization. *Front Chem Sci Eng* 7(1): 72-78.
- Mares D, Fasulo MP, Bruni A 1990. Ultraviolet-mediated antimycotic activity of  $\alpha$ -terthienyl on *Microsporum cookei*. *J. Med. Vet. Mycol.* 28: 469-477.
- Mares D, Tosi B, Poli F, Andreotti E, Romagnoli C 2004. Antifungal activity of *Tagetes patula* extracts on some phytopathogenic fungi: ultrastructural evidence on *Pythium ultimum*. *Microbiol Res* 159: 295-304.
- Marles RJ, Hudson JB, Graham EA, Breau CS, Morand P, Compadre RL, Compadre CM, Towers GHN, Arnason JT 1992. Structure-activity studies of photoactivated antiviral and cytotoxic thiophenes. *Phytochem. Phytobiol* 56: 479-487.
- Marotti I, Marotti M, Piccaglia R, Natri A, Grandi S, Dinelli G 2010. Thiophene occurrence in different *Tagetes* species: agricultural biomasses as sources of biocidal substances. *J Sci Food Agric* 90: 1210-1217.
- Matzenbacher, NI 2003. Diversidade Florística dos campos Sul-Brasileiros: Asteraceae. *Congr Soc Bot Brasil*, 54: 124-127.
- Mejia-Barajas JA, Delrio EN, Muñoz M, Flores-Garcia A, Martinez-Pacheco MM 2012. Cytotoxic activity in *Tagetes lucida* Cav. *Emir J Food Agric* 24 (2): 142-147.
- Mello JCP, Petrovick PR 2000. Quality control of *Baccharis trimera* (Less.) DC (Asteraceae). hydroalcoholic extracts. *Acta Farm Bonaerense* 19 (3): 213-215.
- Meneses NGT, Martins S, Teixeira JA, Mussatto SI 2013. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Sep Purif Technol* 108: 152-158.
- Ming LC 1994. Estudo e pesquisa de plantas medicinais na agronomia. *Hortic Bras* 12 (1): 3-9.
- Naczki M, Shahidi F 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J Pharm Biomed Anal* 41(5): 1523-42.
- Narita E, Neitzke HC, Souza FCD, Monteiro LP, Marques LC 2003. Controle de qualidade farmacobotânico de drogas vegetais comercializadas em Maringá – ano 2002. *Infarma* 15 (7-8): 70-73.
- Nikkon F, Habib MR, Saud ZA, Karim MR 2011. *Tagetes erecta* Linn and its mosquitocidal potency against *Culex quinquefasciatus*. *Asian Pac J Trop Biomed* 1 (3): 186-188.
- Oliveira AL, Padilha CD, Ortega GG, Petrovick PR 2001. *Achyrocline satureoides* (LAM.) DC. (Marcela), Asteraceae, avaliação comparativa da droga vegetal e estudos preliminares de otimização da extração. *Caderno de Farmácia*, 17(1): 33-38.
- Ong ES 2004. Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *J Chromatogr B* 812: 23-33.
- Pathak N, Mittal PK, Singh OP, Vidya Sagar D, Vasudevan P 2000. Larvicidal action of essential oils from plants against the vector mosquitoes *Anopheles stephensi* (Liston), *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Aedes aegypti* (L.). *International Pest Control* 42 (2): 53-55.
- Peres FSC, Fernandes OA, Silveira LCP, Silva CSB 2009. Cravo-de-defunto como planta atrativa para tripes em cultivo protegido de melão orgânico. *Bragantia* 68 (4): 953-960.
- Piccaglia R, Marotti M, Chiavari G, Gandini N 1997. Effects of harvesting date and climate on the flavonoid and carotenoid contents of marigold (*Calendula officinalis* L.). *Flavour Frag J* 12 (85-90).
- Piccaglia R, Marotti M, Grandi S 1998. Lutein and lutein ester content in different types of *Tagetes patula* and *T. erecta*. *Ind Crop Prod* 8: 45-51.
- Picman, AK 1986. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochem Syst Ecol* 14(3): 255-281.
- Prakash O, Rout PK, Chanotiya CS, Misra LN 2012. Composition of essential oil, concrete, absolute and SPME analysis of *Tagetes patula* capitula. *Ind Crop Prod* 37: 195-199.

- Quackenbush FW, Miller SL 1972. Composition and analysis of the carotenoids in marigold petals. *J. Assoc. Anal. Chem* 55: 617–621.
- Ramya R, Mahna S, Bhanumathi SP, Bhat SK 2012. Analysis of phytochemical composition and bacteriostatic activity of *Tagetes* sp. *International Research Journal of Pharmacy* 3(11): 114-115.
- Reis C, Andrade JC 1996. Planejamento experimental para misturas usando cromatografia em papel. *Quim Nova* 19 (3): 313-319.
- Restello RM, Menegatt C, Mossi AJ 2009. Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). *Rev Bras Entomol* 53 (2): 304-307.
- Rhama S, Madhavan S 2011. Antibacterial activity of the flavonoid, patulitrin isolated from the flowers of *Tagetes erecta* L. *Int J Pharmtech Res* 3 (3): 1407-1409.
- Rodda R, Kota A, KS, Ch R, NV 2011. Antidiabetic potential of *Tagetes erecta* whole plant in streptozotocina induced diabetic rats. *Journal of Pharmacy Research* 4 (11): 4032-4034.
- Romagnoli C, Bruni R, Andreotti E, Rai MK, Vicentini CB, Mares D 2005. Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capita from wild Indian *Tagetes patula* L. *Journal Protoplasma* 225: 57-65.
- Rondón M, Velasco J, Hernández J, Pecheneda M, Rojas J, Morales A, Carmona J, Díaz T 2006. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) collected from the Venezuela Andes. *Rev. Latinoam. Quím* 34: 1-3.
- Rupasinghe HPV, Kathirvel P, Huber GM 2011. Ultrasonication – assisted solvent extraction of quercetin glycosides from 'Idared' apple peels. *Molecules* 16: 9783-9791.
- Saleem R, Ahmad M, Naz A, Siddiqui H, Ahmad SI 2004. Hypertensive and Toxicological Study of Citric Acid and Other Constituents from *Tagetes patula* Roots. *Arch Pharm Res* 27:1037-1042.
- Scheffé H 1958. Experiments with mixtures. *J R Stat Soc B2*: 344-360.
- Seigies AT, Pritts M 2006. Cover crop rotations alter soil microbiology and reduce replant disorders in strawberry. *Hortscience* 41: 1303–1308.
- Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hras AR, Simonic M, Knez Z 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem* 89: 191–198.
- Snyder LR 1978. Classification of the solvent properties of common liquids. *J Chromatogr Sci* 16: 223-234.
- Sonaglio D, Ortega GG, Petrovick PR, Bassani VL. Desenvolvimento tecnológico de produção de fitoterápicos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR 2003. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p. 289-326.
- Souza VC, Lorenzi H 2008. *Botânica Sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II*. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flor.
- Steiner G 1941. Nematodes parasitic on and associated with roots of marigolds (*Tagetes* hybrids). *P Bio Soc Wash* 54: 31–34.
- Suatmadji RW 1969. *Studies on the effect of Tagetes species on plant parasitic nematodes*. Netherlands: Wageningen, Veenman en Zonen.
- Sutfeld R, Balza F, Towers GHN 1985. A benzofuran from *Tagetes patula* seedlings. *Phytochemistry* 24 (4): 876-877.
- Szarka S, Gyurján I, László M, Héthelyi E, Kuzovkina IN, Lemberkovics E, Szoke E 2010. GC-MS studies of thiophenes in the supercritical fluid CO<sub>2</sub> and solvent extracts of *Tagetes patula* L. *Chromatographia* 71: 1039-1047.
- Szarka SZ, Hethelyi E, Lemberkovics E, Kuzovkina IN, Banyai P, Szoke E 2006. GC and GC-MS studies on the essential oil and thiophenes from *Tagetes patula* L. *Chromatographia*. 63: S67–S73.
- Tereschuk ML, Riera MVQ, Castro GR, Abdala LR 1997. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. *J Ethnopharmacology* 56: 227-232.

- Tereschuk ML, Baigori MD, Abdala LR 2003. Antibacterial activity of *Tagetes terniflora*. *Fitoterapia* 74: 404-406.
- Tomova BS, Waterhouse JS, Dobe RSK 2005. The effect of fractionated *Tagetes* oil volatiles on aphid reproduction. *Entomol Exp Appl* 115 (1): 153-159.
- Tonuci LRS, Melo NI, Dias HJ, Wakabayashi KAL, Aguiar GP, Aguiar DP, Mantovani ALL, Ramos RC, Groppo M, Rodrigues V, Veneziani RCS, Cunha WR, Silva Filho AA, Magalhães LG, Crotti AEM 2012. In vitro shistosomicidal effects of the essential oil of *Tagetes erecta*. *Rev Bras Farmacogn* 22 (1): 88-93.
- Tosi B, Donini A, Bonora A, Bruni A 1988. Accumulation and distribution of tiophenes in *Tagetes patula*. *Pharmacol Res Commun* 20 (5): 117-121.
- Upadhyaya K, Chanotiya CS, Padalia R, Bhatt ZA, Bahuguna YM 2010. Comparative phytochemistry and pharmacological evaluation of *Tagetes minuta*. *Journal of Pharmacy Research* 3 (6): 1434-1437.
- Vasudevan P, Kashyao S, Sharma S 1997. *Tagetes*: a multipurpose plant. *Bioresource Technol* 62: 29-35.
- Vieira AFC, Dal Bello LHA 2006. Experimentos com mistura para otimização de processos: uma aplicação com respostas não normais. *Pesquisa Operacional* 26 (3): 605-623.
- Wang M, Tsao R, Zhan GS, Dong Z, Yang R, Gong J, Pei Y 2006. Antioxidant activity, mutagenicity/antimutagenicity, and clastogenicity/anticlastogenicity of lutein from marigold flowers. *Food Chem Toxicol* 44: 1522-1529.
- Wijekoon MMJO, Bhat R, Karim AA 2011. Effect of extraction solvents on the phenolic compounds and antioxidant activities of bunga kantan (*Etlingera elatior* Jack.) inflorescence. *J Food Compos Anal* 24: 615-619.
- Wolf, LC 2008. Avaliação da qualidade físico-química de drogas vegetais. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Maringá.
- World Health Organization 2011. *The world medicines situation 2011*. Geneva: WHO.
- Xu LW, Chen J, Qi HY, Shi YP 2012. Phytochemicals and their biological activities of plants in *Tagetes* L. *Chinese Herbal Medicines* 4(2): 103-117.
- Zardini EM 1984. Ethnobotanic of Argentine Compositae with special reference to pharmacological use (in Spanish). *Acta Farm Bonaerense* 3: 169-194.
- Zuanazzi JAS, Montanha JA 2007. Flavonóides. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR 2007. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p. 577-612.

## ANEXO 1

Resultados de resíduo seco (RS), flavonoides totais (CFT) e capacidade antioxidante (CA) dos diferentes extratos obtidos por planejamento simplex-centroide, com misturas de acetona, etanol e água.

| Extrato               | RS (% p/p)<br>Média ± DP (CV%) | CFT (% p/p)<br>Média ± DP (CV%) | CA (IC <sub>50</sub> - µg/mL)<br>Média ± DP (CV%) |
|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------|---|
| EBRAc                 | 6,622                          | 23,709                          | 17,317  |
|                       | 6,622                          | 26,083                          | 17,367  |
|                       | 6,622                          | 24,646                          | 16,055  |
|                       | 6,622                          | 25,192                          | 15,316  |
|                       | 4,415                          | 24,359                          | 15,766  |
|                       | 6,622                          | 23,101                          | 16,067  |
|                       | 6,622                          | 24,195                          | 14,720  |
|                       | 8,829                          | 25,628                          | 14,332  |
|                       | 6,621                          | 25,231                          | 14,759  |
|                       | 6,621                          | 25,227                          | 15,74 ± 1,09 (6,92%)                              |
|                       | 4,414                          | 27,251                          |   |
|                       | 8,828                          | 25,089                          |   |
|                       | 6,62 ± 1,33 (20,10%)           | 24,493                          |   |
|                       |                                | 24,792                          |   |
|                       |                                | 26,121                          |   |
|                       | 25,895                         |                                 |   |
|                       | 26,196                         |                                 |   |
|                       | 25,13 ± 1,02 (4,07%)           |                                 |   |
| EBRE                  | 33,106                         | 18,037                          | 23,361  |
|                       | 33,106                         | 16,574                          | 22,594  |
|                       | 30,899                         | 17,656                          | 22,297  |
|                       | 30,899                         | 16,363                          | 26,033  |
|                       | 30,899                         | 16,229                          | 25,422  |
|                       | 44,146                         | 16,168                          | 26,057  |
|                       | 35,317                         | 18,579                          | 25,751  |
|                       | 28,695                         | 16,686                          | 26,459  |
|                       | 33,110                         | 15,818                          | 26,359  |
|                       | 33,110                         | 16,426                          | 24,93 ± 1,68 (6,75%)                              |
|                       | 30,897                         | 17,038                          |   |
|                       | 28,690                         | 16,889                          |   |
|                       | 33,104                         | 17,581                          |   |
|                       | 30,897                         | 16,590                          |   |
|                       | 26,483                         | 16,314                          |   |
| 32,22 ± 3,98 (12,37%) | 16,131                         |                                 |   |
|                       | 16,011                         |                                 |   |
|                       | 16,77 ± 0,77 (4,60%)           |                                 |   |

|        |  |  |  |
|--------|--|--|--|
| EBRA   | 37,516<br>46,344<br>35,310<br>37,516<br>33,103<br>33,102<br>37,516<br>39,723<br>39,723<br>44,147<br>41,940<br>39,732<br>41,940<br>41,940<br>39,25±3,89 (9,91%) | 5,306<br>4,866<br>5,089<br>5,138<br>4,598<br>5,288<br>4,667<br>4,866<br>4,549<br>4,692<br>4,399<br>3,951<br>4,129<br>3,961<br>4,030<br>4,64±0,47 (10,08%)  | 115,157<br>111,813<br>113,181<br>116,227<br>117,660<br>119,603<br>109,985<br>116,494<br>112,729<br>114,76±3,07 (2,67%) |
| EBREAc | 19,863<br>15,449<br>13,242<br>13,242<br>11,036<br>13,243<br>13,243<br>13,243<br>19,864<br>11,036<br>13,243<br>11,036<br>13,243<br>13,92±2,90 (20,86%)          | 24,696<br>24,256<br>22,236<br>23,087<br>22,477<br>23,008<br>22,135<br>22,161<br>23,818<br>22,135<br>22,774<br>23,350<br>24,214<br>25,085<br>23,996<br>23,915<br>24,145<br>24,394<br>23,44±0,96 (4,12%) | 19,370<br>19,283<br>19,250<br>14,725<br>14,979<br>15,672<br>18,269<br>18,502<br>19,903<br>17,77±2,06 (11,57%)          |
| EBRAAc | 44,147<br>39,732<br>46,354<br>39,732<br>41,940<br>39,733<br>41,940<br>41,940<br>39,723<br>41,929<br>41,929<br>39,723<br>41,57±2,07 (4,98%)                     | 15,534<br>15,190<br>16,168<br>15,905<br>15,944<br>16,460<br>15,144<br>15,099<br>13,791<br>13,646<br>14,097<br>13,342<br>14,503<br>13,211<br>12,854<br>12,440<br>12,922                                 | 23,986<br>24,883<br>26,323<br>21,559<br>21,562<br>20,996<br>26,542<br>27,838<br>25,652<br>24,37±2,49 (10,24%)          |

|                    |                    |                              |                    |
|--------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|
| EBRAAc (cont.)     |                    | 13,474<br>14,43±1,28 (8,86%) |                    |
| EBREA              | 41,928             | 15,252                       | 24,446             |
|                    | 41,928             | 13,195                       | 23,740             |
|                    | 44,135             | 14,316                       | 25,549             |
|                    | 41,928             | 13,572                       | 28,140             |
|                    | 41,939             | 13,907                       | 26,772             |
|                    | 41,939             | 13,646                       | 25,634             |
|                    | 41,939             | 12,416                       | 24,618             |
|                    | 39,732             | 12,735                       | 24,554             |
|                    | 46,355             | 13,769                       | 25,661             |
|                    | 41,940             | 12,441                       | 25,46±1,35 (5,29%) |
|                    | 39,733             | 12,834                       |                    |
|                    | 30,903             | 12,293                       |                    |
|                    | 41,20±3,68 (8,94%) | 12,513                       |                    |
|                    |                    | 13,585                       |                    |
|                    |                    | 12,390                       |                    |
|                    | 12,221             |                              |                    |
|                    | 13,19±0,86 (6,55%) |                              |                    |
| EBREAAc            | 41,935             | 12,440                       | 23,056             |
|                    | 41,935             | 11,571                       | 23,378             |
|                    | 39,728             | 11,653                       | 23,552             |
|                    | 39,728             | 11,246                       | 20,393             |
|                    | 41,935             | 12,006                       | 21,284             |
|                    | 37,524             | 11,392                       | 21,983             |
|                    | 46,353             | 13,572                       | 20,891             |
|                    | 39,731             | 13,439                       | 21,154             |
|                    | 39,731             | 14,267                       | 21,129             |
|                    | 39,731             | 13,746                       | 21,87±1,18 (5,38%) |
|                    | 39,732             | 13,410                       |                    |
|                    | 41,940             | 13,410                       |                    |
|                    | 35,318             | 13,791                       |                    |
|                    | 37,525             | 12,834                       |                    |
|                    | 37,525             | 13,696                       |                    |
| 40,02±2,62 (6,55%) | 13,608             |                              |                    |
|                    | 13,926             |                              |                    |
|                    | 12,94±1,00 (7,76%) |                              |                    |

## ANEXO 2 – Artigo Revista Fitos

**Estudo Farmacognóstico de Flores de *Tagetes patula* L. (Asteraceae)****Pharmacognostic Study of the Flowers of *Tagetes patula* L. (Asteraceae)**

<sup>1</sup>Vanessa M. Munhoz; <sup>1</sup>Renata Longhini; <sup>2</sup>Tayara A. P. Silva; <sup>3</sup>Audrey A. S. G. Lonni; <sup>4</sup>José Roberto P. Souza; <sup>1</sup>Gisely C. Lopes; <sup>1</sup>João Carlos P. Mello\*

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR, Brasil.

<sup>2</sup>Aluna de Iniciação Científica, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil.

<sup>4</sup>Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil.

\*Correspondência: e-mail: mello@uem.br

**Palavras chave:**

*Tagetes patula*; Avaliação farmacognóstica; Triagem fitoquímica; Perfil cromatográfico; Flavonoides.

**Keywords:**

*Tagetes patula*; Pharmacognostic evaluation; Phytochemical screening; Chromatographic profile; Flavonoids.

**Resumo**

O estudo foi conduzido para o desenvolvimento de parâmetros farmacognósticos de flores de *Tagetes patula* L. As avaliações foram realizadas de acordo com a Farmacopeia Brasileira e/ou literatura especializada. Testes colorimétricos detectaram a presença de flavonoides, taninos e fenólicos simples. Por meio de técnicas cromatográficas: cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi possível desenvolver um perfil cromatográfico adequado e estabelecer a presença das substâncias quercetina e rutina. Os resultados para a perda por dessecação, teor de cinzas totais, teor de extrativos, teor de resíduo seco e teor em flavonoides totais foram de: 9,35%, 5,50%, 39,54%, 46,61% e 5,24% respectivamente. No ensaio por hidro-destilação, o rendimento do óleo essencial nas flores foi de 0,15%. Estes dados fornecem informações importantes para a correta identificação e padronização de flores de *T. patula*.

**Abstract**

The current study was conducted to develop the pharmacognostic standards for *Tagetes patula* flowers. These evaluations were performed according to the Brazilian Pharmacopoeia and/or literature specialized. Colorimetric tests detected the presence flavonoids, tannins and simple phenolics. By thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) it was possible to develop a fingerprint suitable and correlating the presence of chemical substances, quercetin and rutin. The results for loss on drying, total ash content, extractives content, total solids content and total flavonoid content were: 9.35%, 5.50%, 39.54%, 46.61%, and 5.81%, respectively. The yield of essential oil in flowers was 0.15%. This study provides important information for correct identification and standardization of flowers of *T. patula*.

\* Autor para correspondência: João Carlos Palazzo de Mello, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brasil, E-mail: mello@uem.br, Tel. + 55 44 3011 4816, Fax: + 55 44 3011 5050.

## Introdução

*Tagetes patula* L. (Asteraceae), popularmente conhecida como cravo-francês, cravo-de-defunto ou botões-de-solteirão, tem origem no México. Foi introduzida no Brasil há muitos anos, onde se aclimatou perfeitamente, tornando-se subespontânea. A espécie é muito utilizada como ornamental em jardins e floeiras, sendo comercializada livremente em feiras populares e floriculturas (Vasudevan, Kashyap e Sharma, 1997). Na medicina popular suas flores e folhas têm sido utilizadas como antisséptica, diurética, depurativa e repelente de insetos (Chadha, 1976).

A investigação de sua composição química aponta até o presente, flores e folhas ricas em terpenos (Dharmagadda et al., 2005; Restello, Menegatt e Mossi, 2009) flavonoides (Piccaglia, Marotti e Grandi, 1998; Faizi et al., 2011a), alcaloides (Faizi e Naz, 2002), carotenoides (De Las Rivas, 1989), tiofenos (Rajasekaran, Ravishankar e Reddy, 2004) e ácidos graxos (Deineka et al., 2007), substâncias estas que provavelmente estejam envolvidas com as atividades biológicas relatadas até o momento, entre elas: atividade inseticida (Wells, Bertsch e Perich, 1993), nematocida (Buena et al., 2008), larvicida (Rajasekaran, Ravishankar e Reddy, 2004; Dharmagadda et al., 2005; Faizi et al., 2011b), hepatoprotetora (Vasilenko et al., 1990), anti-hipertensiva (Saleem et al., 2004), analgésica (Faizi et al., 2011a), anti-inflamatória (Kasahara et al., 2002), antibacteriana (Rondón et al., 2006), antiviral (Ananil et al., 2000), antifúngica (Mares et al., 2004; Romagnoli et al., 2005; Faizi et al., 2008) e como corante para alimentos (Vasudevan, Kashyap e Sharma, 1997).

No entanto, apesar da ampla literatura sobre as propriedades biológicas e constituição química da espécie, não existem relatos publicados sobre os parâmetros farmacognósticos para a avaliação da droga vegetal *T. patula*. Assim, diante do potencial da espécie para o desenvolvimento de fitoterápicos e/ou insumos naturais inseticidas e nematocidas, é premente o estabelecimento de parâmetros de qualidade para a espécie. Visando dar uma contribuição ao estudo farmacognóstico da espécie *T. patula*, este trabalho tem o intuito de pesquisar a presença de constituintes do metabolismo secundário, determinar o teor de óleo essencial, perda por dessecação, teor de cinzas totais, teor de extrativos, teor de resíduo seco, teor em flavonoides, e estabelecer um perfil cromatográfico a partir de flores cultivadas.

## Materiais e métodos

**Material vegetal:** Sementes de *T. patula* foram fornecidas por doação por Syngenta Flowers Brazil e cultivadas organicamente no Horto de Plantas Medicinais

da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. As flores de *T. patula* foram coletadas em novembro de 2011 e o material foi identificado pelo Prof. Dr. Jimi Naoki Nakagima, da Universidade Federal de Uberlândia. Material testemunho encontra-se depositado como documento taxonômico no Herbário da Universidade Estadual de Maringá sob o número HUM 21.907.

As flores foram secas em estufa de circulação forçada de ar (Pardal), aquecida a  $38 \pm 2$  °C e cominuídas em moinho de martelo (Tigre ASN5).

**Preparação do extrato:** Para a obtenção do extrato, a droga vegetal foi utilizada sem separação granulométrica. O material vegetal foi inicialmente desengordurado com *n*-hexano por maceração dinâmica durante seis dias. Após secagem, as flores desengorduradas ficaram em maceração por 10 min e em seguida foram submetidas à extração utilizando dispersor Ultra-Turrax® (Ika, T-25) a 8000 rpm, na proporção de 2,5% (m/v), utilizando como líquido extrator uma mistura etanol:água (1:1 v/v), por um período de 9 min, com intervalos de 10 min, para que a temperatura não excedesse 40 °C. Após, o extrato foi filtrado, evaporado sob pressão reduzida e liofilizado (EB).

**Solventes e reagentes:** Todos os solventes e reagentes utilizados apresentavam grau analítico. Quercetina (Acros Organics) e Rutina (Fluka) foram usados como substâncias químicas de referência. Soluções estoques dos padrões foram preparadas na concentração de 100 µg/mL em metanol.

**Avaliação físico-química:** As análises para a determinação de perda por dessecação e determinação do teor de cinzas totais, foram realizadas de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010). A determinação do teor de extrativos, empregando-se a água como solvente, está de acordo com a técnica descrita em Deutsches (1986). Para a avaliação do teor de resíduo seco, foi produzido um extrato a 2,5% (m/v) em dispersor Ultra-Turrax® (Ika, T-25) a 8000 rpm, com 9,0 min de agitação e temperatura inferior a 40 °C, utilizando como líquido extrator uma mistura de água, etanol e metanol na proporção de 1:1:1 (v/v). Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata.

**Análise fitoquímica preliminar:** A droga vegetal foi submetida à análise fitoquímica preliminar para detecção das principais classes de metabólitos secundários através de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitação, característico para cada classe de substâncias estudadas (Harborne, 1998; Schenkel, Gosmann e Athayde, 2011).

**Análise cromatográfica:** Para o ensaio por cromatografia em camada delgada (CCD), foram utilizadas



placas de alumínio de gel de sílica F254 (Merck®), (100 x 50 mm). O cromatograma foi desenvolvido em câmara saturada, empregando como fase móvel uma mistura de tolueno, acetato de etila, metanol e ácido fórmico (55:35:15:6; v/v), tendo como substâncias de referência, quercetina e rutina. O EB foi retomado em metanol na concentração de 1,45 mg/mL. Alíquotas do extrato (20 µL) e das soluções padrões (10 µL) foram adicionadas sobre a placa com o auxílio de micropipetas volumétricas, na forma de bandas. A placa foi desenvolvida a uma distância de 80 mm, à temperatura ambiente. Após o desenvolvimento, foi seca em estufa à temperatura de 105 °C, e em seguida pulverizada com difenilborato de aminoetanol a 1% (p/v) em metanol, seguido de uma solução de macrogol 400 a 5% (p/v) em metanol. Após, foi examinada sob luz ultravioleta (254 e 365 nm) para visualização das bandas.

Para a cromatografia líquida de alta eficiência, o EB foi retomado em metanol na concentração de 725 µg/mL. Foi empregado cromatógrafo líquido Thermo® equipado com PDA (photo diode array), detector espectrofotométrico (modelo Finnigan Surveyor PDA Plus Detector), bombas e degasser integrado (Finnigan Surveyor LC Pump Plus), autosampler (Finnigan Surveyor Autosampler Plus), equipado com um loop de 10 µL e controlador de software Chromquest. A temperatura do forno para coluna foi mantida em 25 °C e os cromatogramas foram observados a 210, 254 e 370 nm. Para o desenvolvimento dos cromatogramas, foram usados pré-coluna (4 x 3 mm d.i.) e coluna (250 x 4,6 mm d.i.) C-18 Phenomenex®, modelo Gemini, porosidade 5 µm. A separação cromatográfica foi realizada utilizando água (fase A) e acetoneitrila (fase B) em sistema gradiente, com vazão de 1,0 mL/min. O programa estabelecido foi: 0 min: 5% fase B; 35 min: 58% fase B. Após, 5 min para reequilíbrio da coluna com 5% da fase B.

**Determinação de flavonoides totais:** Medições espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu UV-Vis, modelo PC-1650, com cubetas de quartzo QS. A determinação do teor de flavonoides totais na droga vegetal foi realizada seguindo o método proposto na monografia da calêndula, de acordo com a Farmacopeia Brasileira, (2010), com algumas modificações. O ensaio foi realizado em triplicata.

**Determinação do teor de óleos essenciais:** A determinação do teor de óleos essenciais foi conduzida de acordo com o método geral proposto para a determinação de óleos voláteis em drogas vegetais (Farmacopeia Brasileira, 2010). A avaliação foi realizada em triplicata.

**Análise estatística:** A avaliação estatística dos resultados foi realizada através do Software STATISTICA® e Excel®.

## Resultados e Discussão

Os resultados da avaliação físico-química estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1. Características físico-químicas de flores de *T. patula* (n=3).**

| Especificação         | (%) Média ±DP (CV%) |
|-----------------------|---------------------|
| Perda por dessecação  | 9,35±0,2 (2,14)     |
| Teor de cinzas totais | 5,50±0,2 (3,61)     |
| Teor de extrativos    | 39,54±0,52 (1,32)   |
| Teor de resíduo seco  | 46,61±0,49 (1,05)   |

DP= desvio padrão; CV%= coeficiente de variação em percentagem

A perda por dessecação, ensaio importante para a qualidade de drogas vegetais, refere-se ao teor de umidade e/ou substâncias voláteis presentes na espécie. O excesso de umidade em matérias-primas vegetais permite a ação de enzimas, com a possibilidade da degradação de constituintes químicos e desenvolvimento de fungos e bactérias (Farias, 2011). De acordo com Simões et al. (2011), o teor máximo de umidade estabelecido para drogas vegetais em diferentes farmacopeias varia entre 8 e 14%, com poucas exceções especificadas em monografias. O valor obtido no ensaio para *T. patula* foi inferior a 14%, indicando que as operações preliminares empregadas no processamento pós-coleta (secagem e armazenamento), foram efetivas quanto à normalização do teor de umidade na droga vegetal. Em estudo realizado por Gazim et al. (2007), com as flores de calêndula, os resultados encontrados foram 11,6% de umidade residual nas flores secas, valor indicado como adequado, pois segundo os autores, o teor de umidade permitido em flores secas deve permanecer entre 8 a 15%. Assim, pode-se afirmar que valores característicos de perda por dessecação, além de informação importante do ponto de vista tecnológico, servem também como parâmetro de qualidade para as flores de *T. patula*.

A determinação do teor de cinzas totais de um vegetal constitui um ensaio de pureza para verificar impurezas inorgânicas não-voláteis, que podem estar presentes como contaminantes (Farmacopeia Brasileira, 2010). O teor de cinzas totais estabelece a quantidade de substâncias residuais não voláteis, obtidas por incineração, representando a soma de material inorgânico integrante da espécie (cinzas intrínsecas) com as substâncias aderentes de origem terrosa (cinzas extrínsecas) (Simões et al., 2011). Isso significa que essa determinação é uma referência de qualidade e caracterização de um vegetal. Assim, a finalidade desse ensaio foi estabelecer o parâmetro de cinzas totais para *T. patula*, visto que o mesmo ainda não foi descrito na literatura. Na análise de cinzas totais o resultado foi 5,50%±0,2 (3,61%). Como não existem

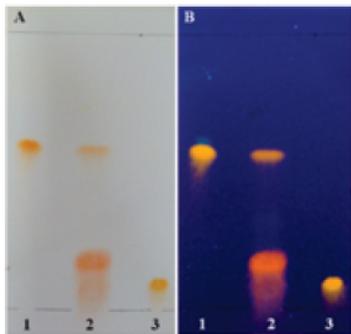
teores máximos para cinzas totais estabelecidos oficialmente para a espécie em estudo, este dado pode nortear futuras averiguações de cinzas totais na espécie.

A determinação do teor de extrativos (TE) é um ensaio utilizado para estimar o potencial de substâncias extraíveis da droga vegetal em água, como aminoácidos, açúcares, heterosídeos flavonoídicos e mucilagens. Esta característica individual pode ser considerada como um parâmetro importante na avaliação da qualidade da droga vegetal, pois está relacionada às características sazonais, ou seja, a produção de determinados grupos de metabólitos secundários, durante as estações do ano. As flores de *T. patula* apresentaram um teor de extrativos de  $39,54\% \pm 0,52$  (1,32%), que poderá ser utilizado como parâmetro para a avaliação de novos lotes de matéria-prima vegetal. Outro parâmetro avaliado, e considerado como uma característica individual para a droga vegetal é a determinação do teor de resíduo seco (RS), utilizando como líquido extrator uma mistura de água, etanol e metanol em proporção volumétrica. Neste ensaio o resultado foi de  $46,61\% \pm 0,49$  (1,05%).

A triagem fitoquímica foi conduzida para caracterizar a composição química das flores de *T. patula*. Os resultados obtidos na avaliação fitoquímica preliminar corroboraram dados de literatura sobre a presença de compostos fenólicos na espécie, entre eles flavonoides, fenólicos simples e taninos. Foi observada uma maior intensidade nas reações para flavonoides. Essa intensidade pode ser devido à função desses constituintes em proteger os vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além de proteger contra insetos, fungos, vírus e bactérias. As reações para os taninos foram menos acentuadas do que para os fenólicos simples.

Todas as identificações na CCD foram baseadas na comparação das distâncias de migração (valores de Rf) e da cor das bandas entre a amostra e os padrões utilizados, antes e após a pulverização da placa com o agente cromogênico específico (Figura 1).

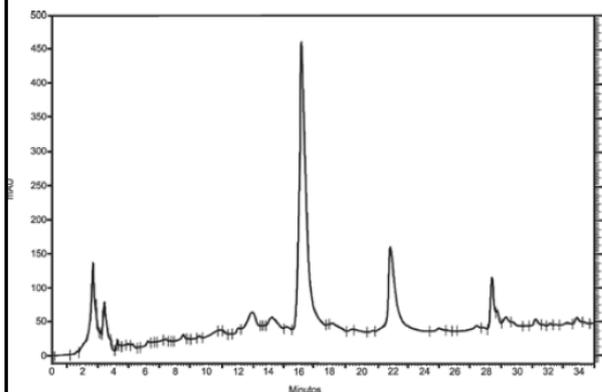
**Figura 1. Cromatograma realizado após pulverização com agente cromogênico específico (reagente natural). (A) sob luz natural (B) sob luz UV à 365 nm. (1) quercetina; (2) extrato bruto; (3) rutina.**



A CCD é uma ferramenta que permite analisar a composição e a pureza do material estudado, auxiliando na identificação de problemas como a adulteração ou falsificação da espécie vegetal de interesse. É um método descrito em monografias de droga vegetais de vários códigos oficiais como ensaio de identificação e autenticidade. De acordo com o perfil cromatográfico obtido e correspondência com os valores de Rf dos padrões verifica-se que EB apresenta manchas correspondentes à quercetina (Rf= 0,58) e rutina (Rf= 0,10) com maiores intensidades, bem como uma terceira banda muito intensa com valor de Rf de 0,18. Assim, a metodologia desenvolvida na obtenção de um perfil cromatográfico por CCD para o EB de flores de *T. patula* mostrou-se adequada para o reconhecimento da espécie, e pode ser utilizado como “*impressão digital*” para a droga vegetal, nas condições avaliadas.

Através do desenvolvimento de um sistema gradiente para a separação dos constituintes químicos do EB por CLAE (Figura 2), foi possível obter uma boa separação dos picos de interesse em 35 min. Por esse sistema foi possível determinar o tempo de retenção da quercetina (15,96 min) através dos dados espectroscópicos do padrão.

**Figura 2. Perfil cromatográfico a 210 nm do EB de flores de *T. patula*. Pico correspondente a quercetina em 15,96 min. Condições cromatográficas: pré-coluna (4 x 3 mm d.i., 5 µm), C-18, coluna (250 x 4.6 mm d.i.; 5 µm), Phenomenex® Gemini C-18; fase móvel: água (fase A) e acetonitrila (fase B); 0 min: 5% fase B; 35 min: 58% fase B. com 5 min para reequilíbrio da coluna; vazão: 1,0 mL/min; detecção: 210 nm.**



Os resultados obtidos com as análises cromatográficas (CCD e CLAE) mostraram que os métodos desenvolvidos são ferramentas simples e sensíveis, e que podem ser prontamente utilizadas como adequados para assegurar a autenticidade de flores de *T. patula*. A presença de flavonoides em *T. patula* foi confirmada pela expressiva intensidade na reação de Shino-

da, e corroborada pelos dados de literatura sobre o isolamento desta classe de metabólitos secundários na espécie (Piccaglia, Marotti e Grandi, 1998; Faizi et al., 2011a). Assim, optou-se pela determinação do teor de flavonoides na droga vegetal. O resultado do ensaio para a determinação de flavonoides totais foi de  $5,24\% \pm 0,08$  (1,53%), média muito superior ao encontrado para drogas vegetais ricas em flavonoides descritas na literatura (Santos e Blatt, 1998; Petrovick e Mello, 2000; Borella e Fontoura, 2002). Provavelmente, este dado esteja relacionado com a época de colheita (sazonalidade) e com a intensidade de insolação, visto que a espécie foi cultivada em canteiros ensolarados.

O rendimento de óleo essencial em massa seca foi de  $0,15\% \pm 0,007$  (4,66%). Resultado muito semelhante aos 0,14 % (m/m) descrito por Szarka e colaboradores (2006), que avaliaram a presença de monoterpenos, sesquiterpenos e tiofenos em flores de *T. patula*.

No Brasil, um dos grandes desafios na utilização das plantas medicinais é a baixa qualidade das matérias-primas vegetais. Os problemas mais frequentes são as adulterações, a não uniformidade da composição química e as contaminações, que podem ocorrer em qualquer uma das etapas na cadeia produtiva (Farias et al., 1985). Portanto, o estabelecimento de parâmetros de qualidade para as drogas vegetais de uso medicinal é fundamental para a consolidação da Fitoterapia, como prática médica segura e eficaz.

Assim, os resultados obtidos neste estudo desempenham um papel significativo na definição de parâmetros farmacognósticos para a caracterização e identificação de flores de *T. patula*, e contribuem para a obtenção de padrões de qualidade para a espécie vegetal.

## Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação Araucária, Agro Aliança Comercial Atibaia Ltda., distribuidor exclusivo da Syngenta Flowers Brazil pela doação das sementes e a Admir Arantes e Claudio Roberto Novello pela colaboração e auxílio técnico.

## Referências

Ananil, K.; Hudson, J.B. Souza, C. Akpaganal, K. Tower, G.H.N. Amasom, J.T. e Gbeasson, M. 2000 - Investigation of medicinal plants of togo for antiviral and antimicrobial activities. *Pharmaceutical Biology*, v.38, p. 40-45.

Borella J.C.; Fontoura, A. 2002 -. Avaliação do perfil cromatográfico e do teor de flavonóides em amostras de *Baccharis trimera* (Less) DC., Asteraceae (carqueja) comercializadas em Ribeirão Preto, SP, Brasil. *Revista Brasileira Farmacognosia*, v.12, p.63-67.

Buena, A.P.; Diez-Rojo, M.A. Lopez-Perez, J.A. Robertson, L. Escuer, M. Bello, A. 2008 - Screening of *Tagetes patula* L. on different populations of *Meloidogyne*. *Crop Protection*, v.27, p.96-100.

Chadha, YR. 1976 -. *Tagetes* Linn (Compositae). *The Wealth of India*, v.10, p.109-112.

De Las Rivas, J. 1989 - Reversed-phase high performance liquid chromatographic separation of lutein and lutein fatty acid esters from marigold flower petal powder. *Journal of Chromatograph*, v.464, p.442-447.

Deineka, V.I.; Sorokopudov, V.N. Deineka, L.A. Tretyakov, M.Y. 2007 - Flowers of marigold (*Tagetes*) species as a source of xanthophylls. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, v.41, p.540-542

Deutsches Arzneibuch. 1986 - 9 ed. Stuttgart: Wissenschaftliche.

Dharmagadda V.S.S.; Naik, S.N. Mittal, P.K. Vasudevan P. 2005 - Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. *Bioresource Technology*, v.96, p.1235-1240.

Faizi, S.; Naz, A. 2002 - Jafrine, a novel and labile  $\beta$ -carboline alkaloid from the flowers of *Tagetes patula*. *Tetrahedron*, v.58, p.6185-6197.

Faizi, S.; Siddiqi, H. Bano, S. Naz, A. Mazhar, K. Nasim, S. Riaz, T. Kamal, S. Ahmad, A. Khan, A.S. 2008 - Antibacterial and antifungal activities of different parts of *Tagetes patula*: preparation of patuletin derivatives. *Pharmaceutical Biology*, v.46, p.309-320.

Faizi, S.; Dar, A. Siddiqi, H. Naqvi, S. Naz, A. Bano, S. Lubna, A. 2011a -. Bioassay-guided isolation of antioxidant agents with analgesic properties from flowers of *Tagetes patula*. *Pharmaceutical Biology*, v.49, p.516-525.

Faizi, S.; Fayyaz, S. Bano, S. Iqbal, E.Y. Lubna, A. Siddiqi, H. Naz, A. 2011b - Isolation of nematicidal compounds from *Tagetes patula* L. yellow flowers: structure-activity relationship studies against cyst nematode *Heterodera zea* infective stage larvae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.59, p.9080-9093.

Farias M.R.; Schenkel, E.P. Bergold, A.M. Petrovick, P.R. 1985 - O problema na qualidade dos fitoterápicos. *Caderno de Farmácia*, v.1, p.73-82.

Farias M.R. 2011 - Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: Simões C.M.O.; Schenkel E.P.; Gosmann G.; Mello J.C.P.; Mentz L.A.; Petrovick P.R. (org.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, p. 199-222. 6. Ed. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC.

- Farmacopeia Brasileira. 2010 - 5. ed. v.1. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA.
- Gazim Z.C.; Ferreira G.A.; Rezende C.M.; Nakamura C.V.; Dias Filho B.P.; Cortez D.A.G. 2007 - Identificação dos constituintes químicos da fração volátil da *Calendula officinalis* produzida no Paraná. *Horticultura Brasileira*, v. 25, p.118-121.
- Harborne, J.B. 1998 - *Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. 3rd ed., London: Chapman and Hall.
- Kasahara, Y.; Yasukawa, K. Kitanaka, S. Khan, T.M. Evans, F.J. 2002 - Effect of methanol extract from flower petals of *Tagetes patula* L. on acute and chronic inflammation model. *Phytotherapy Research*, v.16, p.217-222.
- Mares, D.; Tosi, B. Poli, F. Andreotti, E. Romagnoli, C. 2004 - Antifungal activity of *Tagetes patula* extracts on some phytopathogenic fungi: ultrastructural evidence on *Pythium ultimum*. *Microbiological Research*, v.159, p.295-304.
- Mello, J.C.P.; Petrovick, P.R. 2000 - Quality control of *Baccharis trimera* (Less.) DC (Asteraceae). hydroalcoholic extracts. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v.19, p.213-215.
- Piccaglia, R.; Marotti, M. Grandi, S. 1998 -. Lutein and lutein ester content in different types of *Tagetes patula* and *Tagetes erecta*. *Industrial Crops and Products*, v.8, p.45-50.
- Rajasekaran, T.; Ravishankar, G.A. Reddy, B.O. 2004 - In vitro growth of *Tagetes patula* L. hairy roots, production of thiophenes and its larvicidal activity. *Indian Journal of Biotechnolog*, v.3, p.92-96.
- Restello, R.M.; Menegatt, C. Mossi, A.J. 2009 - Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, v.53, p.304-307.
- Romagnoli, C.; Bruni, R. Andreotti, E. Rai, M.K. Vicentini, C.B. Mares, D. 2005 - Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capita from wild Indian *Tagetes patula* L. *Journal Protoplasma*, v.225, p.57-65.
- Rondón, M.; Velasco, J. Hernández, J. Pecheneda, M. Rojas, J. Morales, A. Carmona, J. Díaz, T. 2006 - Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) collected from the Venezuela andes. *Revista Latinoamericana de Química*, v.34, p.32-36.
- Saleem, R.; Ahmad, M. Naz, A. Siddiqui, H. Ahmad, S.I. 2004 - Hypertensive and toxicological study of citric acid and other constituents from *Tagetes patula* roots. *Archives of Pharm. Research*, v.27, p.1037-1042.
- Santos, M.D.; Blatt, C.T.T. 1998 - Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miens. de mata e de cerrado. *Revista Brasileira de Botânica*, v.21 n.2, p.135-140.
- Schenkel, E.P.; Gosmann, G. Athayde, M.L. 2011 - Saponinas. In: SIMÕES, C.M.O. (org). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. Ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/ Editora da UFRGS, p. 711-740.
- Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. 2011 - *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. Ed. Editora UFRGS e UFSC, Porto Alegre/Florianópolis.
- Szarka, S.Z; Hethelyi, E. Lemberkovics, E. Kuzovkina, I.N. Banyai, P. Szoke, E. 2006 - GC and GC-MS studies on the essential oil and thiophenes from *Tagetes patula* L. *Chromatographia*, v.63, p.S67-S73.
- Vasilenko Y.K.; Bogdanov, A.N. Frolova, L.M. Frolov, A.V. 1990 - Hepatoprotective properties of preparations from spreading marigold. *Khimico Farmatsevticheskii Zhurnal*, v.24, p.53-56.
- Vasudevan, P.; Kashyap, S. Sharma, S. 1997 - *Tagetes*: a multipurpose plant. *Bioresource Technology*, v.62, p.29-35.
- Wells, C.; Bertsch, W. Perich, M. 1993 - Insecticidal volatiles from the marigold plant (genus *Tagetes*). Effect of species and sample manipulation. *Chromatographia*, v.35, p.209-215.

