

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANÁLISE
FITOQUÍMICA DE *Lippia sidoides* Cham.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Viviane de Oliveira Garcia

**Santa Maria, RS, Brasil
2009**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANÁLISE
FITOQUÍMICA DE *Lippia sidoides* Cham.**

por

Viviane de Oliveira Garcia

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientador: Prof^a. Dr^a. Berta Maria Heinzmann

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

A Comissão Organizadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação De Mestrado

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E
ANÁLISE FITOQUÍMICA DE *Lippia sidoides* CHAM.**

elaborada por
Viviane de Oliveira Garcia

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA

Berta Maria Heinzmann, Dra.
(Presidente/Orientador)

Fabiana E. Barcellos da Silva, Dra. (UNIPAMPA)

Sydney Hartz Alves, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 25 de agosto de 2009.

Aos meus pais Coraldino e Zenith, à minha irmã Lisiane, que me incentivaram com compreensão, amor e carinho nesta jornada.

OFEREÇO

À minha fiel escudeira, Lenise e ao meu namorado, Ederson, que sempre estiveram comigo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

À Profa. Dra. Berta Maria Heizmann (UFSM) pela confiança em mim depositada, pela amizade e orientação durante esse período.

Aos professores Rosmari Hörner (UFSM), Bernardo Baldisseroto (UFSM), Tatiane Emanuelli (UFSM), Érico M. Flores (UFSM), Elton Franceschi (URI), José Vladimir de Oliveira (URI) pela disponibilidade e ensinamentos a mim transmitidos.

Aos doutorandos Fábio Andrei Duarte e Diogo Pompéo de Moraes, aos mestres Lenise de Lima Silva, Luiz Gustavo Brenner Reetz, Anelise Murari, às mestrandas Clarissa Giesel Heldwein e Vanessa Oliveira Domingues, às alunas Simone Cristina Benovit e Mariane Minozzo, que muito contribuíram para o meu trabalho.

“La science est la
connaissance organisée. La
sagesse est la vie organisée.”

Immanuel Kant

RESUMO

Projeto de Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANÁLISE FITOQUÍMICA DE *Lippia sidoides* Cham.

Autora: Viviane de Oliveira Garcia

Orientadora: Berta Maria Heizmann

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 25 de agosto de 2009.

Lippia sidoides Cham. é uma das espécies indicada para integrar o programa de fitoterapia no SUS, e se caracteriza pela atividade antimicrobiana, atribuída aos elevados teores de timol e carvacrol em suas folhas. Outros constituintes que contribuem para esta atividade são flavonóides e naftoquinonas. Objetivando a otimização da atividade antimicrobiana de preparações galênicas simples obtidas a partir desta planta, bem como a busca por um método extrativo menos poluente e ao mesmo tempo rentável, foram preparados extratos por sete diferentes métodos. Maceração, percolação a quente, extração por banho e sonda de ultrassom, extração por microondas e extração por fluído supercrítico foram avaliados em relação ao rendimento de extrato seco, consumo de tempo e solvente bem como quanto à atividade antimicrobiana. O extrato obtido por percolação a quente foi o mais rentável (26,3%) enquanto que o método que consumiu maior tempo e solvente foi a maceração (30240 min e 2300 ml, respectivamente). A extração ultrassônica por banho e aquela utilizando sondas, uma de 130W e outra de 750W, apresentaram valores intermediários quanto ao consumo de tempo e solvente (60 min e 125-250 ml), sendo que não apresentaram nenhuma vantagem considerando-se os parâmetros avaliados. No ensaio da atividade antimicrobiana, o extrato obtido por fluído supercrítico apresentou valores de concentração inibitória mínima (CIM) menores para as bactérias testadas, tanto contra Gram-positivos, quanto contra Gram-negativos. A caracterização química do extrato com os menores valores de CIM foi realizada através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), e permitiu a identificação de timol e carvacrol como compostos majoritários além de acetato de timol, *Z*-cariofileno, *E*-cariofileno, germacreno D e óxido de cariofileno, bem como outros constituintes traço. A extração por fluído supercrítico utilizando CO₂ foi feita a 50°C e 150 bar e mostrou-se superior na seletividade de extração dos compostos ativos.

Palavras-chave: *Lippia sidoides* Cham.; métodos extrativos; atividade antibacteriana.

ABSTRACT

ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF *Lippia sidoides* CHAM.

Author: Viviane de Oliveira Garcia

Advisor: Berta Maria Heinzmann

Lippia sidoides Cham. is a plant indicated to integrate the Brazilian phytotherapy program of SUS; this species is characterized by its antimicrobial activity due to its amounts of thymol and carvacrol. Other constituents that contribute for this activity are flavonoids and naphthochinones. Aiming to optimize the use of simple galenic preparations obtained from this plant as antimicrobial agent, as well as to find a extraction procedure with environmental friendly characteristics and with good yields, we evaluated seven different extracts. Maceration, extraction by soxhlet, ultrasound-assisted extraction, microwave-assisted extraction and supercritical fluid extraction were compared in relation to the yield of dry extract, time and solvent consumption and antibacterial activity. The extract obtained by soxhlet was more profitable (26.3%), whereas the extract obtained by maceration spent more solvent and also time (30240 min and 2300 ml, respectively). The ultrasonic extraction by bath and horn, one of 130W and another of 750W, furnish extracts with intermediate values in time and solvent consumption (60 min e 125-250 ml), and not presented any advantages in extraction considering the evaluated parameters. The extract obtained by supercritical fluid extraction used CO₂ and showed lower values of minimal inhibitory concentration for all bacterial strains tested and in generally it was superior to the other methods against both Gram-negative as Gram-positives. The characterization of the extract with the lowest MIC values was performed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), allowing the identification of thymol, carvacrol as major components. Additionally, thymol acetate, *Z*-cariophyllene, *E*-cariophyllene, germacrene D and cariophyllene oxide, as well as trace constituents were identified. The supercritical fluid extraction (SFE) performed at 50° C and 150 bar also proved be superior in selectivity for the extraction of the active substances.

Keywords: *Lippia sidoides* Cham.; extractive methods; antibacterial activity.

RÉSUMÉ

ACTIVITÉ ANTIBACTERIENNE ET L'ANALYSE PHYTOCHIMIQUE DE *Lippia sidoides* CHAM.

Auteur: Viviane de Oliveira Garcia

Directeur: Berta Maria Heinzmann

Lippia sidoides Cham. est l'une des espèces indiquées pour intégrer le programme de la phytothérapie dans le SUS, et se caractérise par une activité antimicrobienne, attribuée à des niveaux élevés de thymol et carvacrol dans ses feuilles. D'autres constituants qui contribuent à cette activité sont des flavonoïdes et des naphthoquinones. Dans le but d'optimiser l'activité antimicrobienne de préparations galéniques simples obtenues à partir de cette plante, ainsi que la recherche d'une méthode d'extraction moins polluantes, tout en restant rentable, des extraits ont été réalisés à partir de sept méthodes différentes. La macération, percolation à chaud, l'extraction par ultrason, la sonde et de bain, micro-ondes et d'extraction fluide supercritique ont été évaluées pour le rendement de l'extrait sec, de la consommation de temps et de solvants ainsi que l'activité antimicrobienne. Cette dernière a été évaluée selon le document recommandés par le NCCLS M7-A6. L'extrait obtenu par percolation à chaud a été plus rentable (26,3%), tandis que la méthode qui consomme plus de temps et de solvant est la macération (30240 ml min et 2300, respectivement). L'extraction par et, à l'aide de sonde, de 130 W et de 750 W respectivement présentent, à montré des valeurs intermédiaires à la consommation de temps et de solvant (60 min et 125-250 ml), qui ne présente pas d'avantage compte tenu des paramètres évalués. Dans le test de l'activité antimicrobienne, l'extrait obtenu par le fluide supercritique, en général, ont montré la concentration minimale inhibitrice (CMI) plus élevée pour les bactéries testées, à la fois contre les gram-positifs et les gram-négatifs. La caractérisation chimique de l'extrait avec la plus faible des valeurs de CMI a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), permettant l'identification de thymol et carvacrol, ainsi que les principaux composés d'acétate de thymol, Z-caryophyllène, E-caryophyllène, germacrene D et de l'oxyde de caryophyllène, ainsi que de traces. L'extraction en utilisant le fluide supercritique de CO₂ a été réalisé à 50°C et 150 bar et s'est montrée supérieure à la sélectivité de l'extraction de composés actifs.

Mots-clés: *Lippia sidoides* Cham.; Méthodes de l'extrait, l'activité antimicrobienne.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – <i>Lippia sidoides</i> Cham.....	20
FIGURA 2 – Representação do processo extrativo de uma partícula da matriz vegetal.....	38
FIGURA 3 – Extração por percolação à quente usando aparelho de Soxhlet convencional.....	39
FIGURA 4 – Ciclo de compressão e expansão causados por ondas ultrassônicas.....	40
FIGURA 5A e 5B – Extração por banho de ultrassom e extração por sonda ultrassônica.....	42
FIGURA 6 – Transferência de massa provocada por ondas ultrassônicas.....	43
FIGURA 7 – Espectro eletromagnético.....	45
FIGURA 8A e 8B – Aquecimento por convecção e aquecimento por irradiação com microondas.....	46
FIGURA 9A e 9B – Sistemas de aquecimento em vias fechados e abertos...	48
FIGURA 10 – Gráfico temperatura x pressão de substância pura em estado supercrítico.....	53
FIGURA 11 - Esquema básico de um extrator por fluido supercrítico.....	55
FIGURA 12 – Variação da densidade de CO ₂ em função da pressão e da temperatura.....	60
FIGURA 13 – Forno adaptado por Craveiro <i>et al.</i> , 1989, para extração por microondas.....	66
FIGURA 14 – Fórmulas estruturais dos constituintes majoritários de <i>L. sidoides</i> Cham.....	95

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Principais diferenças entre os métodos extrativos.....	62
QUADRO 2 – Estratégias de otimização para técnicas de extração por fluido supercrítico e extração por microondas.....	64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 <i>Lippia sidoides</i>	19
2.2 MANUSCRITO 1.....	21
2.3 Métodos extrativos utilizados para plantas medicinais.....	37
2.4 Princípios gerais da extração.....	37
2.5 Métodos extrativos clássicos: maceração e percolação a quente (soxhlet).....	38
2.6 Extração por ultrassom.....	39
2.6.1 Extratores de ultrassom.....	41
2.6.2 Extração de material vegetal por ultrassom.....	42
2.7 Extração por microondas.....	44
2.7.1 Principais elementos de um microondas.....	48
2.7.2 Extração de material vegetal por microondas.....	49
2.7.3 Fatores que afetam a extração por microondas.....	49
2.7.3.1 Natureza do solvente.....	49
2.7.3.2 Volume do solvente.....	50
2.7.3.3 Tempo de extração.....	50
2.7.3.4 Força das microondas.....	51
2.7.3.5 Características da matriz.....	51
2.7.3.6 Temperatura.....	52
2.8 Extração por fluido supercrítico.....	52
2.8.1 Uso de modificadores.....	56
2.8.2 Efeito da matriz na extração por fluido supercrítico.....	57
2.8.3 Seletividade.....	58
2.8.4 Influência da temperatura e pressão.....	60
2.9 Vantagens/devantagens e otimização dos diferentes métodos extrativos....	61
2.10 Métodos extrativos de plantas medicinais: um enfoque sobre os métodos empregados na pesquisa com <i>Lippia sidoides</i>	66
2.10.1 Extração por microondas de <i>L. sidoides</i>	66
2.10.2 Extração por fluido supercrítico de <i>L. sidoides</i>	67
3 MANUSCRITO 2.....	69

4.DISSCUSSÃO.....	89
5.CONCLUSÕES.....	102
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105

"La folie est de toujours se comporter de la même manière et de s'attendre à un résultat différent." Albert Einstein.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais é uma prática tradicional existente entre os povos de todo o mundo e é a base dos sistemas de medicina tradicional que tem persistido por milhares de anos. Os primeiros achados foram encontrados em registros sob escrita cuneiforme na Mesopotâmia em 2600 a.C., mas a grande parte da população do planeta, continua usando plantas medicinais para seus cuidados diários com a saúde (GURIB-FAKIM, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define a medicina tradicional como:

(...) a soma dos conhecimentos, habilidades e práticas baseadas em teorias, crenças e experiências a partir de diferentes culturas, sejam ou não explicáveis, usados na manutenção da saúde bem como no diagnóstico, prevenção ou eliminação de doenças físicas e mentais. Medicina tradicional abrange uma ampla variedade de terapias e práticas que variam de país para país e região para região. Em alguns países, é referida como medicina "alternativa" ou "complementar" (WHO, 2009).

A Declaração de Alma-Ata de 1978, contendo importantes recomendações dos órgãos diretivos da OMS já salientava a importância da medicina tradicional, dos seus praticantes e do dever do poder público de formular políticas nacionais, estratégias e planos de ação para promover os cuidados primários de saúde como parte de um sistema nacional de saúde (WHO, Declaration of Alma-Ata, 1978).

Em 2002, OMS lançou uma estratégia voltada para medicina tradicional, com a finalidade de ajudar os países a explorar seu potencial de saúde e bem-estar para as pessoas, visando minimizar riscos e erros no uso de medicamentos, cuja eficácia e segurança não fossem comprovados. O objetivo desta estratégia é encorajar ainda mais as pesquisas no setor (BODEKER, KRONENBERG, 2002.).

No Brasil, a Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares no SUS, propõe a inclusão da fitoterapia, homeopatia, acupuntura e medicina

antroposófica como opções terapêuticas no sistema público de saúde. Essa política traz, dentre suas diretrizes para fitoterapia, a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e da Relação Nacional de Fitoterápicos, bem como a garantia do acesso a plantas medicinais e fitoterápicos aos usuários do SUS. Assim, o governo federal instituiu, por meio do Decreto Presidencial de 17 de fevereiro de 2005, uma comissão interministerial para elaboração da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF). As diretrizes desta lei são:

- Regular o cultivo; o manejo sustentável; a produção, a distribuição, e o uso de plantas medicinais e fitoterápicos, considerando as experiências da sociedade civil nas suas diferentes formas de organização.
- Promover a formação técnico-científica e capacitação no setor de plantas medicinais e fitoterápicos.
- Incentivar a formação e capacitação de recursos humanos para o desenvolvimento de pesquisas, tecnologias e inovação em plantas medicinais e fitoterápicos;
- Estabelecer estratégias de comunicação para divulgação do setor plantas medicinais e fitoterápicos.
- Fomentar pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação com base na biodiversidade brasileira, abrangendo espécies vegetais nativas e exóticas adaptadas, priorizando as necessidades epidemiológicas da população;
- Promover a interação entre o setor público e a iniciativa privada, universidades, centros de pesquisa e Organizações Não Governamentais na área de plantas medicinais e desenvolvimento de fitoterápicos;
- Apoiar a implantação de plataformas tecnológicas piloto para o desenvolvimento integrado de cultivo de plantas medicinais e produção de fitoterápicos;
- Incentivar a incorporação racional de novas tecnologias no processo de produção de plantas medicinais e fitoterápicos
- Garantir e promover a segurança, a eficácia e a qualidade no acesso a plantas medicinais e fitoterápicos.
- Promover e reconhecer as práticas populares de uso de plantas medicinais e remédios caseiros.

- Promover a adoção de boas práticas de cultivo e manipulação de plantas medicinais e de manipulação e produção de fitoterápicos, segundo legislação específica;
- Promover o uso sustentável da biodiversidade e a repartição dos benefícios derivados do uso dos conhecimentos tradicionais associados e do patrimônio genético;
- Promover a inclusão da agricultura familiar nas cadeias e nos arranjos produtivos das plantas medicinais, insumos e fitoterápicos.
- Estimular a produção de fitoterápicos em escala industrial.
- Estabelecer uma política intersetorial para o desenvolvimento socioeconômico na área de plantas medicinais e fitoterápicos.
- Incrementar as exportações de fitoterápicos e insumos relacionados, priorizando aqueles de maior valor agregado.
- Estabelecer mecanismos de incentivo para a inserção da cadeia produtiva de fitoterápicos no processo de fortalecimento da indústria farmacêutica nacional.

Como consequência das diretrizes citadas, foi publicada em 10 de dezembro de 2008 a Portaria Interministerial nº 2.960, que aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) no Brasil e cria o Comitê Nacional que deliberará sobre o assunto. O referido comitê é composto por representantes do Governo e da Sociedade Civil e suas atribuições, entre outras, são avaliar a ampliação das opções terapêuticas aos usuários, a garantia de acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à Fitoterapia no SUS; acompanhar as iniciativas de promoção à pesquisa, desenvolvimento de tecnologias e inovações nas diversas fases da cadeia produtiva (Portaria Interministerial-2.960 – M.S.).

Em virtude da alta tecnologia, dos elevados custos e dos riscos inerentes para o desenvolvimento de um novo medicamento, poucos países desenvolvidos liderados pelos Estados Unidos, detêm as maiores indústrias farmacêuticas mundiais que dominam as modernas tecnologias na área farmacêutica (PINTO *et al.*, 2002).

No Brasil, mais recentemente, empresas nacionais de maior porte como a Aché, Biossintética, Eurofarma, Flora Medicinal, entre outras, estão interessadas na produção e comercialização dos fitomedicamentos.

De 1998 a 2003 foram depositadas junto ao INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial) 15 patentes na área de plantas medicinais e fitoterápicos, embora nenhuma surgida no Brasil. Segundo Calixto (2003) as indústrias farmacêuticas nacionais ainda não possuem experiência em pesquisa e desenvolvimento, mantendo-se dependentes de tecnologia desenvolvida em países industrializados.

Contudo, os pesquisadores brasileiros têm à mão a matéria prima mais abundante e diversificada do planeta. Estima-se que 20% desse patrimônio genético esteja concentrado em território nacional, onde o índice de endemismo é altíssimo sendo, só de vegetais, 55 mil espécies (22% do total registrado no planeta), embora, apenas 10% da biodiversidade mundial tenha sido estudada (PINTO, 2002, CALIXTO, 2003).

Um exemplo de planta pesquisada desde a década de 70 e que ainda não originou um medicamento no Brasil é *L. sidoides* Cham., que cresce na região da caatinga brasileira, entre outras.

A caatinga é um a bioma muito vulnerável, que abrange uma vasta área e abriga muitas plantas amplamente utilizadas na medicina tradicional pelas comunidades que a habitam. O gênero *Lippia*, da família Verbenaceae, apresenta grande número de taxons não identificados ao nível de espécie, mas que são um importante componente do bioma do ponto de vista botânico, e apresentam potencial econômico como fonte de matéria-prima. *Lippia sidoides* apresenta um óleo essencial que é tão ou mais rico em timol que o de *Thymus vulgaris*. Popularmente, a planta é usada como antisséptico e no tratamento de problemas respiratórios (MATOS, OLIVEIRA, 1998; ALBUQUERQUE *et al.*, 2007).

Para *Lippia sidoides* foram realizados vários estudos relacionados ao potencial antibacteriano e antifúngico de seu óleo essencial e de extratos brutos. Dos artigos revisados neste trabalho, relacionados à atividade antimicrobiana do óleo essencial, todos foram obtidos por hidrodestilação, enquanto que trabalhos feitos com extratos brutos foram realizados a partir da extração com etanol ou etanol-água.

Como é de conhecimento geral, métodos convencionais de extração como hidrodestilação e extração por solventes, por exemplo, apresentam parâmetros

pouco ajustáveis durante o processo extrativo de matérias-primas vegetais (LANG, WAI, 2001).

Por este motivo, técnicas extrativas alternativas que visem economia de tempo e solvente, que sejam pouco poluentes e seletivas tornam-se cada vez mais atraentes em pesquisa. Logo, considerando-se que *Lippia sidoides* é uma das espécies de interesse para fazer parte do programa de fitoterapia no SUS, Sistema Único de Saúde (HEINZMANN, 2006) torna-se pertinente realizar uma investigação que relacione a atividade de diferentes extratos desta planta contra espécies de bactérias padrão ATCC e isolados clínicos, realizada através de testes de sensibilidade *in vitro*.

Nesta dissertação, foi realizada análise da atividade antimicrobiana de extratos obtidos através de cinco diferentes métodos extrativos:

- maceração,
- extração por soxhlet,
- extração por ultrassom,
- extração por microondas,
- extração por fluído supercrítico.

Em relação ao método ultrassônico, duas diferentes técnicas foram utilizadas:

- sonicação indireta, através de banho ultrassônico,
- sonicação direta, através de sondas ultrassônicas de diferentes potências.

Portanto foram avaliados métodos clássicas e modernos, em uma abordagem que relaciona o gasto de solvente orgânico, o consumo de tempo e a facilidade do método com o seu rendimento e o seu potencial antimicrobiano. Os resultados obtidos através dos ensaios de atividade foram comparados estatisticamente e aquele que apresentou a melhor potência teve sua composição química analisada.

Nesta perspectiva, o presente trabalho propõe:

- A obtenção de extratos a partir das partes aéreas de *L. sidoides* Cham. através de 7 diferentes técnicas extrativas;
- Comparação da atividade antimicrobiana dos extratos obtidos com determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações bactericidas mínimas (CBM) para os mesmos;
- A obtenção de informações úteis que auxiliem na compreensão dos mecanismos de extração;

- Definição do extrato mais ativo para posterior otimização da extração, levando-se em conta o rendimento e a atividade antibacteriana;
- A determinação da composição química do extrato mais potente frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas utilizadas nos ensaios;
- A escolha de um marcador químico para o extrato mais ativo;
- Comparação das diferentes técnicas extrativas em relação ao consumo de solvente e tempo.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigos científicos. Parte da revisão bibliográfica pode ser encontrada no **Manuscrito 1**, que é um sub-ítem das Referências Bibliográficas. A parte experimental, resultados e discussão deste trabalho são apresentados no **Manuscrito 2**. Na sequência é apresentada uma discussão geral, seguidas das conclusões do trabalho.

"L'ignorant affirme, le savant doute, le sage réfléchit." Aristote.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Lippia sidoides*

Lippia sidoides é um arbusto silvestre densamente ramificado com até 2 m de altura, de flores muito pequenas e dispostas em inflorescências. As folhas desta espécie são aromáticas, caducifólias e grosso-serreadas, com pequeninos pêlos em ambas as faces os quais não são visíveis a vista desarmada, mas sensíveis ao tato. O limbo (6-20 mm de comprimento e 4-17 mm de largura) tem formato ovado e apresenta ápice agudo e base arredondada. A epiderme inferior é semelhante à epiderme superior, diferindo por apresentar maior frequência de pêlos, especialmente os tricomas simples, cônicos, formados por 1-3 células e tricomas glandulares sésseis ou de pedículos formado por 1-3 células com capitel simples ou raramente septado. Em corte paradérmico da epiderme superior encontram-se regiões correspondentes à base do pêlo, aí presentes por causa da queda deste anexo epidérmico. Os estômatos predominantes são diacíticos e anomocíticos. Como característica própria, esta espécie não contém cristais prismáticos de oxalato de cálcio na folha. Apresenta o mesófilo de organização dorsiventral, com parênquima paliádico unisseriado. O caule apresenta casaca sulcada e frágil. Quando as folhas são moídas, apresentam ao microscópio, numerosos grãos de amido. Suas sementes são pequenas, de difícil coleta e baixo índice de germinação. Apresenta odor aromático de timol e sabor picante (MATOS, OLIVEIRA, 1998; NUNES *et al.*, 2000).



Figura 1 - *Lippia sidoides* Cham. Fonte: Fontenelle, 2008.

Segundo Matos (1994) idealizador do Projeto Farmácias Vivas para comunidades carentes do nordeste, as folhas podem ser usadas na forma de chá ou tinturas a 20%, soluções do óleo essencial a 2% em etanol, sabões líquidos e pastas dentifrícias. As preparações da droga vegetal são adequadas para uso tópico contra infecções de pele e mucosas.

Uma revisão das atividades biológicas e dos aspectos químicos envolvendo o uso medicinal desta espécie é descrita no **Manuscrito 1** a seguir.

2.2 MANUSCRITO 1

ASPECTOS QUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS DE *Lippia sidoides* CHAM.

(VERBENACEAE)

Chemical and pharmacological aspects of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae).

Viviane O. GARCIA, Berta M. HEINZMANN*

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia Industrial, Prédio 26, Campus Universitário, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

* e-mail: hberta@ccs.ufsm.br

Resumo: *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae) é uma planta medicinal brasileira conhecida como “alecrim-pimenta”. Suas partes aéreas são usadas na medicina tradicional como agente anti-infeccioso e antisséptico. Esta espécie está sendo incorporada na Farmacopéia Brasileira e é considerada para inclusão no Programa de Fitoterapia do Sistema Único de Saúde do Brasil. Este trabalho faz um relato dos aspectos químicos e farmacológicos relacionadas a esta espécie com o objetivo de resumir todas as informações encontradas na literatura até o momento.

Summary: *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) is a Brazilian medicinal plant popularly known as “alecrim-pimenta”. Its aerial parts are used in the traditional medicine as an anti-infective and antiseptic agent. This species is being incorporated into the Brazilian Pharmacopoeia and is one of the medicinal plants considered to be included in the phytotherapy program of the Brazil’s National Health System. This paper presents a review of chemical and pharmacological aspects related to this species in order to summarize all the information found in the literature until the moment.

Palavras chaves: alecrim-pimenta, *Lippia sidoides*.

Key Words: alecrim-pimenta, *Lippia sidoides*.

Introdução

Das 120 espécies de *Lippia* existentes no Brasil, *Lippia sidoides* Cham. (*L. multicapitata* Mart. ou, popularmente, “alecrim-pimenta”)^{1, 2} destaca-se pela utilização medicinal de suas folhas como antimicrobiano, antiinflamatório, nos casos de distúrbios gastrintestinais, doenças respiratórias e cutâneas.³ Adicionalmente, há registros de patentes protegendo a utilização de *L. sidoides* como agente antimicrobiano em geral e larvicida contra *Aedes aegypti*.⁴

Por suas características, é uma das espécies de interesse para a implementação da fitoterapia no Sistema Único de Saúde,^{5,6} através da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do governo federal brasileiro. A seguir é apresentada uma revisão sobre esta espécie, com o objetivo de reunir informações sobre os aspectos químicos e farmacológicos relacionados a sua utilização medicinal.

Aspectos químicos e atividades do OE

Estudos indicam que plantas do gênero *Lippia* são classificáveis em 3 raças químicas. *L. sidoides* pertence ao quimiotipo timol-carvacrol², duas substâncias de atividade antisséptica e antioxidante. Um resumo dos efeitos biológicos do OE é apresentado na tabela 1.

Tabela 1

Segundo a literatura, cepas sensíveis ao OE nos ensaios *in vitro* são *Staphylococcus aureus*, *S. xylosus*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. cohnii*, *S. haemolyticus*, *Streptococcus salivarius*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. mutans*, *Corynebacterium aerobie*, *Micrococcus luteus*, *M. sedentarius*, *Acinetobacter sp.*, *Moraxella sp.*, *Alcaligenes sp.*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Candida albicans*, *C. utilis*, *C. pseudotropicalis*,

Sacharomices cereviseae, *Cryptococcus neoformans*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Microsporium canis*, *Aspergillus flavus*, *Trichophyton interdigitale*, *T. rubrum*, *T. mentagtophytes*.^{20, 21, 22, 23, 24, 25, 26} Estes resultados explicam o emprego do OE em cimentos dentários²⁷, antissépticos bucais e géis dentais.^{11, 27} Além da atividade antimicrobiana, a ação antiinflamatória foi comprovada em tratamentos de gengivites e periodontites, *in vivo*.^{11, 28} Em humanos, tratamentos de apenas 7 dias apresentaram redução da placa bacteriana e dos sangramentos gengivais.^{7, 8}

O OE em associação com antibióticos demonstrou comportamento sinérgico com ampicilina e cefalotina contra *S. aureus*, além de antagonismo em associação com gentamicina. Pouca interação foi observada contra cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa*. Entretanto, para aquela, houve sinergismo com cefalotina e antagonismo com tetraciclina.²⁹

Validação de metodologia analítica para extratos hidroalcoólicos foi feita através de CCD e CLAE, para a detecção de timol^{30, 31}; metodologia por CLAE-UV foi desenvolvida para tinturas.³²

Foram comparados por Sousa *et al*, 2002 os extratos de folhas obtidos por CO₂ pressurizado (próximo do ponto supercrítico), hidrodestilação e extração com etanol. Estes apresentaram perfil semelhante, com predominância de timol, 1,8-cineol e carvacrol. O conteúdo de timol foi maior, na ordem de extração com etanol > CO₂ pressurizado > hidrodestilação. O conteúdo de sesquiterpenóides foi menor na extração por etanol que nos outros dois métodos, enquanto que os monoterpenóides apresentaram-se em maior quantidade.³³

O OE mostrou-se termoestável quando microencapsulado com goma arábica e maltodextrina em temperaturas de até 185°C.³⁴

Aspectos químicos e atividades do extrato bruto

Os principais constituintes químicos isolados a partir de extratos brutos de *L. sidoides* Cham. são apresentados na tabela 2.

Tabela 2.

Os extratos brutos mostraram atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Micrococcus sp.*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, além de *Salmonella thyphimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Streptococcus mutans*^{38, 39, 40}.

Batista *et al*, 2007, comprovaram a atividade antiinflamatória em teste de edema de orelha em camundongos.⁴¹ O extrato metanólico inibiu a acetilcolinesterase em 60% (*in vitro*),⁴² enquanto que o extrato aquoso (1:160) apresentou atividade leishmanicida. No entanto, estudos utilizando timol (1 µg/ml), apresentaram resultados positivos *in vitro*⁴³, mas não *in vivo*¹⁵. Contra larvas de *Spodoptera frugiperda* o extrato aquoso (10%) não mostrou diferenças em relação aos controles.⁴⁴

Toxicidade

Trabalhos recentes avaliaram a toxicidade do OE^{10, 25}, hidrolato¹³ e extrato etanólico⁴⁵. Nas doses de 100-3000 mg/kg (v.o., camundongos) não foi encontrada nenhuma alteração fisiológica ou histopatológica, entretanto, a DL₅₀ foi de 117,95 mg/kg pela via i.p.²⁵ Albuquerque (2006) avaliou a toxicidade aguda do extrato etanólico (i.p., camundongos) em doses de até 2000 mg/kg. Os animais apresentaram reações iniciais de estimulação que logo após tornaram-se reações depressoras, mas que reverteram após 48 h. Porém, acima de 980 mg/kg houve toxicidade e a DL₅₀ foi de 1329,17 mg/kg e DL₁₀₀ de 2000 mg/Kg.⁴⁵

A literatura descreve que em até 1% o OE não foi alergênico em humanos e coelhos (testes oftálmicos e cutâneos)⁴⁶ e implantes subcutâneos embebidos com extrato hidroalcoólico foram bem tolerados por ratos.⁴⁷

Conclusões

O efeito bactericida e antimicótico do OE das folhas de *Lippia sidoides* Cham., *in vitro*, é vastamente descrito. Atualmente, vêm sendo realizados experimentos *in vivo* avaliando atividades anti-helmínticas^{18, 19} analgésicas,^{9, 41} antiinflamatórias^{10, 41} e antissépticas da cavidade oral¹¹, esta última, inclusive em humanos^{7, 8} com bons resultados. As evidências indicam ser o timol o principal constituinte ativo do OE.

Ensaio de toxicidade sugerem a segurança dos preparados à base desta espécie quando administrados por v.o.^{10, 13, 25, 45, 46, 47}. Entretanto, devem ser realizados estudos *in vivo* adicionais para avaliação do potencial antimicrobiano, analgésico e antiinflamatório de preparados a partir desta espécie.

Referências bibliográficas

1. Pascual, M.E., K. Slowing, E. Carretero, D.S. Mata & A. Villar (2001) *J. Ethnopharmacol.* **76**: 201-14.
2. Bezerra, P., A.G. Fernandes, A.A. Craveiro, C.H.S. Andrade, F.J.A. Matos, J.W. Alencar, M.I.L. Machado, G.S.B.Viana, F.F. Matos & M.Z. Rouquayrol (1980) *6º Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*, Fortaleza, Brasil, págs. 1-14.
3. Albuquerque, U.P., P.M. Medeiros, A.L.S. Almeida, J.M. Monteiro, E.M.F. Lins Neto, J.G. Melo, J. P. Santos (2007) *J. Ethnopharmacol.* **114**: 325–354.
4. <http://pesquisa.inpi.gov.br/MarcaPatente/servlet/PatenteServletController>. Acesso em 26/05/2009.
5. Heinzmann, B.M., comunicação pessoal.
6. Brasil. Atos do poder executivo. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006.
7. Fernandes Filho, E. S., S.M. Morais, S.G.C. Fonseca & O.M.L. Mota (1998) *Rev. Ass. Bras. Odontol.* **6**: 323-25.
8. Botelho, M.A., J.G. Bezerra-Filho, L.L. Correa, S.G.C. Fonseca, D. Montenegro, R. Gapski, G.A.C. Brito & J. Heukelbach (2007) *J. Appl. Oral Sci.* **15**: 175-80.
9. Marçal, R.M., D.M. Ptak, R.R. Krempser, M.R. Krempser, G.C. Cardoso, R.B. Santos, A.F. Blank & P.B. Alves (2006) *Planta Med.* **72**: 291.
10. Monteiro, M.V.B., A.K.R.M. Leite, L.M. Bertini, S.L. Morais & D.C.S. Nunes-Pinheiro (2007) *J. Ethnopharmacol.* **111**: 378-382 .
11. Girão, V.C.C., D.C.S. Nunes-Pinheiro, S.M. Morais, J.L. Sequeira, M.A. Gioso (2003) *Prevent. Vet. Med.* **59**: 95-102.
12. Leite, A.K.R.M., G.Q.Rodrigues, A.K.P. Vasconcelos, L.T. Braga, V.M. Farias, C.A.P. Lopes, S.M. Morais & D.C.S. Nunes-Pinheiro (2002) *Resumos do 12º Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*, Cuiabá, Brasil.

13. Carvalho, A.F.U., V.M.M. Melo, A.A. Craveiro, M.I.L. Machado, M.B. Bantin & E.F. Rabelo (2003) *Inst. Oswaldo Cruz* **98**: 569-71.
14. Cavalcanti, E.S.B., S.M. Morais, M.A.A. Lima & E.W.P. Santana (2004) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **99**: 541-44.
15. Teixeira, M.J., J.G. Holanda-Filha, T. Paschoalette, J.R. Viana, R.C. Prata Jr., M.M.L. Pompeu & I.C.B. Coelho (1998) *Resumos do 15º Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*. Águas de Lindóia, Brasil, pág 91.
16. Oliveira V.C.S., D.M.S. Moura, J.A.D. Lopes, P.P. Andrade, N.H. Silva, R.C.B.Q. Figueiredo (2008). *Parasitol Res.* **104**:1053-9.
17. Costa, J.G.M., F.F.G. Rodrigues, E.C. Angélico, M.R. Silva, M.L. Mota, N.K.A. Santos, . A. L.H. Cardoso & T.L.G. Lemos (2005) *Rev. Bras. Farmacogn.* **15**: 304-9.
18. Camurça-Vasconcelos, A.L.F., C.M.L. Bevilaqua, S.M. Morais, M.V. Maciel, C.T.C. Costa, I.T.F. Macedo, L.M.B. Oliveira, R.R. Braga, R.A. Silva, L.S. Vieira, A.M.C. Navarro (2008) *Vet. Parasitol.* **154**: 167–170.
19. Camurça-Vasconcelos, A.L.F., C.M.L. Bevilaqua, S.M. Morais, M.V. Maciel, C.T.C. Costa, I.T.F. Macedo, L.M.B. Oliveira, R.R. Braga, R.A. Silva & L.S. Vieira (2007) *Vet. Parasitol.* **148**: 288-294.
20. Lacoste, E., J.P. Chaumont, D. Mandin, M.M. Plumel, F.J.A. Matos (1996) *Ann. Pharm. Fr.* **54**: 228-30.
21. Botelho, M.A., N.A.P. Nogueira, G.M. Bastos, S.G.C. Fonseca, T.L.G. Lemos, F.J.A. Matos, D. Montenegro, J. Heukelbach, V.S. Rao & G.A.C. Brito (2007) *Braz. J. Med. Biol. Res.* **40**: 349-56.
22. Bertini, L.M., A.F. Pereira, C.L.L. Oliveira, E.A. Menezes, S.M. Morais, F.A. Cunha, E.S.B. Cavalcanti (2005) *Infarma* **17**: 80-3.

23. Lemos, T.L.G., F.J.A. Matos, J.W. Alencar & A.A. Craveiro (1990) *Phytoher. Res.* **4**: 82-4.
24. Nunes, R.S., R.Q. Ferreira, P.J. Rolim Neto, D.P. Santana, H.S. Xavier & E.A. Ximenes (1998) *Resumos do 15º Simpósio de plantas Mediciniais do Brasil*, São Paulo, Brasil, pág. 54.
25. Fontenelle, R.O.S., S.M. Morais, E.H.S. Brito, M.R. Kerntopf, R.S.N. Brilhante, R.A. Cordeiro, A.R. Tomé, M.G.R. Queiroz, N.R.F. Nascimento, J.J.C. Sidrim, M.F.G. Rocha (2007) *J. Antimicrob. Chemother.* **59**: 934-40.
26. Oliveira, F.P., E.O. Lima, J.P.S. Junior, E.L. Souza, B.H.C. Santos, H.M. Barreto (2006) *Rev. Bras. Farmacogn.* **16**: 510-16.
27. Morais, S.M., E.S. Fernandes Filho, F.J.A. Matos, M.I.L. Machado, J.B. Soares & A.P. S. Andrade (1996) *Rev. Bras. de Farm.* **77**: 42-4.
28. Botelho, M.A., V.C. Rao, C.B.M. Carvalho, J.G. Bezerra-Filho, S.G.C. Fonseca, M.L. Vale, D. Montenegro, F. Cunha, R.A. Ribeiro & G. A. Brito (2007) *J. Ethnopharmacol.* **113**: 471-78.
29. Oliveira, R.A.G., E.O. Lima, W.L. Vieira, K.R.L. Freire, V.N. Trajano, I.O. Lima, E.L. Souza, M.S. Toledo & R.N. Silva-Filho (2006) *Rev. Bras. Farmacogn.* **16**: 77-82.
30. Nunes, R.S., A.A.M. Lira, E. Ximenes, J.A. Silva & D.P. Santana (2005) *Rev. Bras. Farm.* **86**: 80-3.
31. Nunes, R.S., B.A.A. Senna, J.A. Silva & D.P. Santana, (2005) *Rev. Bras. Farm.* **86**: 87-91.
32. Leal, L.K.A.M., V.M. Oliveira, S.M. Araruna, M.C.C. Miranda & F.M.A. Oliveira (2003) *Rev. Bras. Farmacog.* **13**: 09-11.
33. Sousa, E.M.B.D., O. Chiavone-Filho, M.T. Moreno, D.N. Silva, M.O.M. Marques & M.A.A. Meireles (2002) *Braz. J. Chem. Eng.* **19**: 229-41.

34. Fernandes, L.P., W.P. Oliveira, J. Sztatizs & Cs. Novák (2008). *J. Therm. Anal. Calorim.* **94**: 461-467.
35. Macambira, L.M.A., C.H.S. Andrade, F.J.A. Matos, A.A. Craveiro (1986) *J. Nat. Prod.*, **49**: 310-12.
36. Costa, S.M., T.L.G. Lemos, O.D.L. Pessoa, O. D. L., C. Pessoa, R.C. Montenegro & R. Braz-Filho (2001) *J. Nat. Prod.* **64**: 792-95.
37. Lemos, T.L.G., S.M.O. Costa, O.D. Pessoa & R. Braz-Filho (1999) *Magn. Reson. Chem.* **37**: 908-11.
38. Moraes, J.A., M.A. Santos, R.M. Ximenes, J.F.C. Albuquerque.). *Resumos 19º do Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*, Salvador, Brasil.
39. Albuquerque, J.F.C. (2006). *Resumos 19º do Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*, Salvador, Brasil.
40. Bara, M.T.F. & M.C.D. Vanetti (1996/1997) *Rev. Bras. de Farmacogn.* **7/8**: 20-34.
41. Batista, T. G., N.G. Pacheco & E.T. Rangel (2007) *J. Bras. Fitomed.* **5**: 83.
42. Trevisan, M.T.S., F.V.V. Macedo, M. Van de Meent, I.K. Rhee & R. Verpoorte (2003) *Quim. Nova* **26**: 301-4.
43. Façanha, M.C.C., I.F. Cavalcante, M.M.L. Pompeu, J.M. Teixeira, F.J.A. Matos, A.Q. Souza (1995) *Resumos 10º Encontro da Federação das Sociedades de Biologia Experimental*, Caxambu, Brasil, pág. 16.138.
44. Santiago G.P., L.E.M. Pádua, P.R.R. Silva, E.M.S. Carvalho, C.B. Maia (2008) *Ciênc. agrotec., Lavras* **32**: 792-796.
45. Albuquerque, J.F.C. (2006). *Resumos 19º do Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*, Salvador, Brasil.
46. Mendonça, V.L.M., A.A. Craveiro, L.M.B.A. Aguiar, M.C. Fonteles (1990) *Aerosol e Cosméticos* **12**: 10-14.

47. Couto, G.B.L., E. Ximenes, D.P. Santana, A.K. Vidal, M.M.V.B. Vasconcelos, A.C.S. Lima & J.M.B. Silva (2000) *Rev. Cons. Reg. Odontol. Pernambuco* **3**: 83-90.

Tabela 1: Atividades descritas para o óleo essencial de *L. sidoides* Cham.

ATIVIDADE OBSERVADA	DOSES / ADMINISTRAÇÃO	METODOLOGIA / ANIMAL / PREPARADO
Assepsia bucal	0,6 e 1% / Top.	<i>In vivo</i> , índice de placa bacteriana e sangramento gengival / humanos / OE ^{7,8}
Analgésica	100, 200 e 400 mg/kg / s.c.	<i>In vivo</i> , contorções induzidas por ácido acético / camundongos / OE ⁹
Analgésica	100-200 mg/kg / s.c.	<i>In vivo</i> , teste da chapa quente / camundongos / OE ⁹
Antiulcerogênica	10 mg/kg / v.o.	<i>In vivo</i> , indução de lesão gástrica por etanol / camundongos / OE ¹⁰
Antiedematogênica	1-10mg / s.c.	<i>In vivo</i> , teste de edema de orelha / camundongos / OE ¹⁰
Antiinflamatória e antiedematogênica	-	<i>In vivo</i> / cães / enxaguatório bucal ¹¹
Aumento da força de contração	-	<i>In vitro</i> , frênico-diafragma isolado / ratos / H ²
Atividade anticolinérgica bloqueio das contrações produzidas por BaCl ₂	-	<i>In vitro</i> , útero isolado / ratas / H ²
Cronotrópica negativa	-	<i>In vitro</i> , aurícula isolada / ratos / H ²
Inotrópica negativa	-	<i>In vitro</i> , coração isolado / sapos / H ²

Bloqueadora neuromuscular	-	<i>In vitro</i> , gastrocnêmio-ciático isolado / sapos / H ²
Espasmogênica	-	<i>In vitro</i> , reto abdominal isolado / sapos / H ²
Espasmolítica	-	<i>In vitro</i> , duodeno isolado / coelhos e ratos / H ²
Ausência de aumento no título de anticorpos específicos	10 mg/kg / v.o.	<i>In vitro</i> / camundongos / OE ¹²
Larvicida (<i>A. aegypti</i>)	até 1:10	<i>In vitro</i> / OE e H ^{10 13, 14}
Molucida (<i>Biomphalaria glabrata</i>)	até diluição 1:100	<i>In vitro</i> / H ²
Leishmanicida (<i>Leishmania braziliensis</i>)	0,5mg/ml	<i>In vitro</i> / timol ¹⁵
Ausência de atividade leishmanicida (<i>L. braziliensis</i>)	7 mg/kg	<i>In vivo</i> / macrófagos infectados / timol ¹⁵
Leishmanicida (<i>L. chagasi</i>)	75 µg/ml	<i>In vitro</i> / OE ¹⁶
Larvicida (<i>A. aegypti</i> e <i>Culex. quinquefasciatus</i>)	100 ppm	<i>In vitro</i> / OE ¹⁷
Anti-helmíntica	283 mg/kg/v.o.	<i>In vivo</i> / ovelhas / OE ¹⁸
Anti-helmíntica (<i>Syphacia obvelata</i> e <i>Aspiculuris tetráptera</i>)	1600mg/Kg/v.o.	<i>In vivo</i> / camundongos / OE ¹⁹
Larvicida (<i>Haemonchus contortus</i>)	CE ₅₀ 2,97 mg/ml	<i>In vitro</i> / OE ¹⁹

Ovicida (<i>Haemonchus contortus</i>)	CE ₅₀ 0,40mg/ml	<i>In vitro</i> / OE ¹⁹
---	----------------------------	------------------------------------

Tabela 2: Constituintes químicos isolados de *L. sidoides* Cham.

CONSTITUINTES	CLASSE QUÍMICA
α -pineno, mirceno, carvacrol, α -terpineno, <i>p</i> -cimeno, 1,8-cineol, (<i>E</i>)- β -ocimeno, γ -terpineno, (<i>E</i>)-miroxiado, umbelulona, 4-terpineol, α -terpineol, éter metílico do timol, timol, eugenol, α -copaeno, (<i>E</i>)-cariofileno, aromadendreno, α -humuleno, γ -muuroleno, α -selineno, δ -cadineno, β -sitosterol, ácido 3-O-acetil-oleanólico.	terpenóides ^{33, 35, 36}
lapachenol, lipsidoquinona, tecomaquinona, tectoquinona, tectol, acetato de tectol, isocatalponol, 6-oxo-3,4,4a,5-tetraidro 3-hidroxi-2,2-dimetilnafto-1,2-pirano	naftoquinóides ^{34, 36, 37}
isolariciresinol	lignanas ³⁶
quercetina, luteolina, taxifolina, glicoluteolina	flavonóides ³⁶
3,4-diidroxibenzoato de metila	ésteres do ácido benzóico ³⁶
ácido palmítico, ácido esteárico, ácido bênico, ácido araquídico, ácido lignocérico	ácidos orgânicos ³⁵

Legenda Tabela 1: OE: óleo essencial; H: hidrolato; Top.: uso tópico; s.c.: via subcutânea; v.o.: via oral; CE₅₀: concentração efetiva para matar 50% das larvas ou ovos.

2.3 Métodos extrativos utilizados para plantas medicinais

As técnicas de extração tradicionais são geralmente baseadas na escolha do solvente e o uso de aquecimento e/ou agitação para aumentar a solubilidade dos compostos desejados e melhorar a transferência de massa. Usualmente, as técnicas convencionais que utilizam aquecimento, requerem longo tempo de extração e podem acarretar degradação térmica dos fitoconstituintes além de desperdício de tempo e energia. Assim, o processo extrativo ideal deve ser exaustivo em relação aos constituintes ativos, rápido, simples, ecologicamente correto e barato.

Segundo KAUFMANN e CHRISTEN (2002) métodos clássicos de extração de produtos naturais incluem: extração por Soxhlet, maceração, percolação, turbo-extração e sonicação. Estes métodos apresentam desvantagens incluindo longo tempo de extração, morosidade, a grande quantidade de solventes orgânicos empregada, a eficiência de extração insuficiente e o risco de degradação dos compostos.

Nos últimos anos surgiram técnicas extrativas com vantagens sobre os métodos convencionais. Muitos destes métodos têm prós e contras em relação ao uso de solventes, tempo de extração e eficiência (STICHER, 2008).

2.4 Princípios gerais da extração

Um modelo esquemático do processo extrativo pode ser visualizado na figura 2. Considerando-se a matriz como um grão de núcleo impermeável e recoberto por uma camada repleta de poros, de acordo com o modelo de Pawliszym, 1993, os solutos estão fixados na superfície do núcleo e são extraídos em etapas:

- Desligamento do soluto da superfície da matriz;
- Difusão do soluto através dos poros para o solvente;
- Solubilização no solvente.

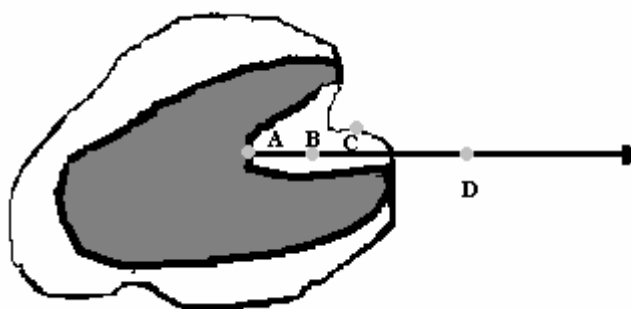


Figura 2 – Representação do processo extrativo de uma partícula da matriz vegetal, onde: AB, desligamento dos solutos do núcleo; BC, difusão; CD, solubilização. Fonte: Pawliszym, 1993.

O desligamento da matriz é o passo mais importante, visto que a solubilidade não é um problema se o solvente for bem escolhido. O processo de extração deve superar as interações entre o analito e a matriz (PAWLISZYM, 1993.)

2.5 Métodos extrativos clássicos: Maceração e Percolação a quente (Soxhlet)

O processo extrativo da maceração é feito em recipiente fechado, a temperatura ambiente, por períodos longos e grande consumo de solvente. Não conduz a um esgotamento da matéria-prima, seja devido à baixa saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o solvente e o interior da célula (VOIT, 1993).

A extração por percolação à quente com soxhlet é a mais utilizada de todas as técnicas para a obtenção de pequenas quantidades de extrato. Serve para a extração visando o isolamento de fitocompostos e como é um modelo padronizado e bem estabelecido, serve como técnica para comparação com outras metodologias (WANG, WELLER, 2006).

Em um aparelho de soxhlet convencional, o material vegetal é colocado dentro de cartucho permeável. O cartucho é posto na porção mais larga do aparelho e recoberto por solvente. Na extremidade inferior deste, encontra-se um balão contendo líquido extrativo, que é submetido a aquecimento constante. O solvente evapora e, ao entrar em contato com o condensador, retorna ao estado líquido e

goteja sobre o cartucho. Quando o líquido atinge o nível máximo, um sifão aspira a solução e a descarrega de volta para o balão de extração. O soluto permanece no balão, enquanto o solvente fresco retorna para o cartucho, que contém a droga vegetal (figura 3). A operação se repete até a extração total ser atingida (WANG, WELLER, 2006).

A maior desvantagem do soxhlet, em comparação com alguns métodos modernos, é o tempo de extração relativamente longo, que pode levar 8, 16, 24 horas ou mais, com um consumo considerável de solvente e de energia térmica. Adicionalmente, a quantidade de amostra a ser processada é um fator limitante e o uso de solvente orgânico requer um passo adicional de reciclagem, filtração e evaporação (MANDAL *et al.*, 2007; HUIE, 2002; CAMEL, 2001; WAGNER, 1993; WANG, WELLER, 2006).

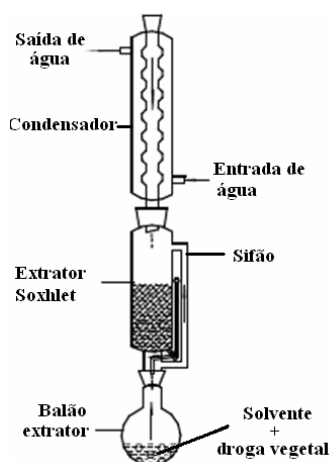


Figura 3 - Extração por percolação a quente usando aparelho de Soxhlet convencional. Fonte: WANG e WELLER, 2006.

2.6 Extração por Ultrassom

O som é formado por ondas de compressão e expansão que passam através de líquidos, sólidos e gases, mas nunca atravessam o vácuo, pois se propagam somente onde existe matéria. Sons audíveis estão na faixa dos 16 Hz a 16 kHz de

freqüência¹, enquanto que a freqüência característica do ultrassom está na faixa dos 16 kHz a 1 MHz (SUSLICK *et al.* 1999).

A produção do ultrassom é um fenômeno físico, baseado no processo de criar, aumentar e implodir bolhas de vapor e gases em um líquido. Durante a etapa de compressão a pressão é positiva, enquanto que a expansão tem pressão negativa (vácuo). Este ciclo de compressão e expansão gera cavidades e por isso o fenômeno é chamado cavitação (figura 4).

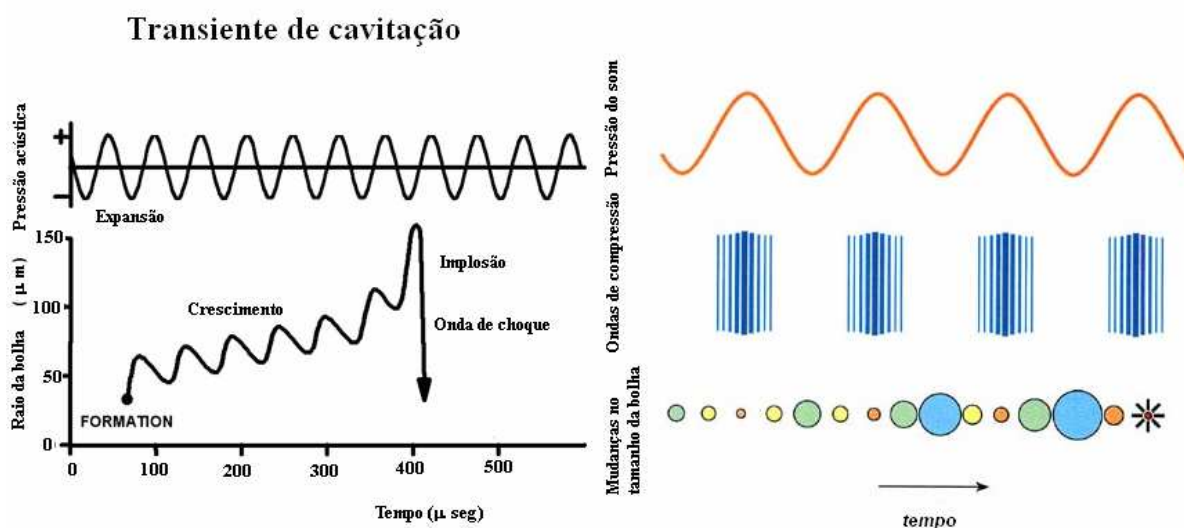


Figura 4 - Ciclo de compressão e expansão causados por ondas ultrassônicas. Fonte: Suslick, 1989.

Quando ondas ultrassônicas são irradiadas num meio líquido, a cavitação leva ao crescimento e ao colapso implosivo de milhões de bolhas microscópicas. A energia potencial da bolha expandida é convertida em energia cinética gerando jatos do líquido, ondas de choque e grandes pressões e temperaturas nos locais de implosão (LUQUE-GARCIA, CASTRO, 2003).

A implosão de bolhas gera colisões de alta velocidade entre as partículas e alterações nos microporos das partículas. Assim, acelera-se o turbilhão de difusão

¹ Um Hz é uma unidade que mede um ciclo de expansão e compressão por segundo.

interno e externo. Além disso, a cavitação próxima a uma superfície sólida causa rápido fluxo de líquido através de cavidades na superfície da partícula, através de microjatos que acabam por causar mais erosão e exposição de novas superfícies, aumentando a transferência de massa (VILKHU, *et al.*, 2008).

Comparativamente, em líquidos puros, a cavidade permanece esférica durante o colapso, pois a circunvizinhança é uniforme. Mas se está próxima das fronteiras de um sólido, o colapso torna-se assimétrico e gera jatos de alta pressão no líquido, que impactam com a superfície deste sólido (SUSLICK, *et al.*, 1999, MARTINES *et al.*, 2000).

2.6.1 Extratores de Ultrassom

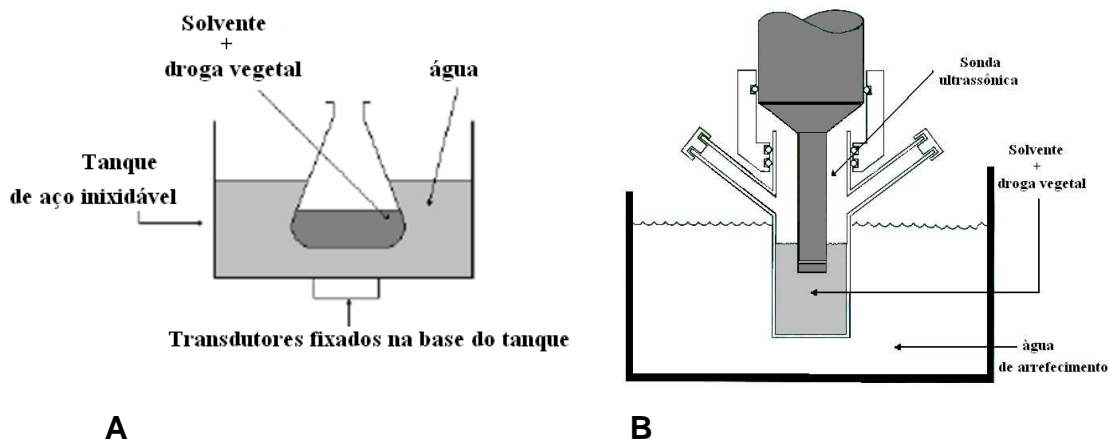
Existem dois modelos de extratores: os banhos ultrasônicos e os extratores conectados a um transdutor, também chamados de sonda ultrasônica (figuras 5A e 5B). Ondas de ultrassom são produzidas pela energia elétrica, usada para causar estresse mecânico em uma superfície sólida. Para criar sons de alta frequência, são aplicados pulsos elétricos alternados e extremamente rápidos em uma cerâmica piezoelétrica² fixada nas paredes de um container de metal, caracterizando um banho de ultrassom. Quando uma haste de titânio imersa em um líquido é submetida a um campo elétrico de corrente alternada, age como um material piezoelétrico, caracterizando uma sonda de ultrassom. A sonda vibra a uma frequência acústica fixa, tipicamente em 20 kHz, mas a intensidade é variável. Por isso a energia envolvida é alta e a solução deve ser arrefecida (SUSLICK, 1989).

Assim, é possível obter extratos por sonicação direta (com sondas) ou indiretas (com banhos), preferencialmente utilizando agitador mecânico e arrefecimento, pois a absorção da energia ultrasônica pode causar aquecimento.

Por sonicação indireta, pouca quantidade de material vegetal pode ser extraída, pois muito da energia se perde para o meio externo, enquanto que pela sonicação direta, quantidades maiores de matéria-prima podem ser extraídas, visto que as ondas são aplicadas diretamente na matéria-prima (VINAROTU, 2001).

² materiais piezoelétricos são os que se expandem e contraem quando um campo elétrico é aplicado

O máximo da força ultrassônica é observada na vizinhança da superfície irradiada pela sonda ultrassônica. A intensidade diminui abruptamente enquanto a distância da fonte de ultrassom aumenta (ROMDHANE *et al.* 1995).



Figuras 5A e 5B - Extração por banho de ultrassom e extração por sonda ultrassônica. Fonte: Suslick, 1989, Vinarotu, 2001.

2.6.2 Extração de material vegetal por ultrassom

Quando há colapso de bolhas geradas por cavitação próximas de partículas de amostras sólidas (partícula vegetal), microjatos de solvente, propagados a uma velocidade maior que 100 m/s, causam erosões mecânicas e ruptura da partícula e consequentemente a diminuição do seu tamanho (CAPELO, MADURO, VILHENA, 2005).

É preciso considerar que a célula vegetal apresenta parede celular. Assim, a extração envolve dois tipos de fenômenos físicos: difusão através da parede celular e lavagem do conteúdo celular quando a parede celular é destruída (figura 6) (VINAROTU, 2001).

Algumas células apresentam características glandulares e podem ser externas ou internas, podendo estar repletas de óleo essencial. Quando externas, possuem paredes muito finas, facilmente destruídas por sonicação. Se as glândulas forem internas, o grau de moagem da droga mostra-se importante. Com isso, ao reduzir o tamanho do material vegetal, aumenta-se o número de células expostas à

sonicação e ao solvente. A quebra das células vegetais por ondas ultrassônicas pode ser feita em banho de ultrassom ou através de sondas.

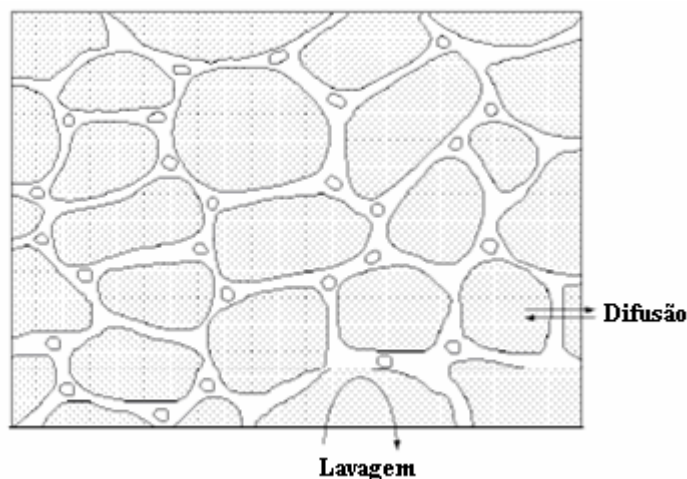


Figura 6 - Transferência de massa provocada por ondas ultrassônicas. Fonte: Vinarotu, 2001.

Quando a droga vegetal é seca, além dos fenômenos físicos da extração descritos acima descritos, ocorre um segundo estágio que é facilitado pela sonicação e compreende:

- a infusão do material vegetal no solvente para facilitar a intumescência e o processo de hidratação.
- a transferência de massa, ou seja, dos constituintes solúveis do material vegetal para o solvente, através de difusão ou processo osmótico (VINAROTU, 2001).

Durante o processo de secagem, o tecido vegetal perde sua capacidade de difusão e osmose, como resultado da dissecação da parede celular e da lamela média. A reidratação durante a intumescência depende do número de hidroxilas presentes nestes órgãos. Em geral a sonicação melhora o processo de amolecimento da pectina via hidratação da lamela média, tornando-a mais maleável. Isto leva à quebra dos tecidos vegetais por vibração ultrassônica. Dados mostram maiores efeitos em 20 kHz que com 500 kHz. Com 20 kHz, a vibração ultrassônica tem forte efeito mecânico em toda a estrutura celular, podendo diminuir o tamanho

das partículas através da sonicação. Já em 500k Hz, o principal efeito é o amolecimento da lamela média. Além disso, é possível que os solutos se difundam através da parede celular, devido a sonicação (TOMA *et al.*, 2001).

Os seguintes parâmetros devem ser avaliados na sonicação: frequência e intensidade do ultrassom, tipo de solvente, bolhas de gás, temperatura e pressão, tamanho da partícula, volume de água utilizada no banho de ultrassom, posição da amostra (vertical ou horizontal); quando for utilizada a sonicação por sonda, devem ser observados, adicionalmente, o diâmetro da sonda, tempo de sonicação e amplitude (CAPELO, MADURO, VILENA, 2005).

2.7 Extração por Microondas

Microondas são ondas eletromagnéticas não-ionizantes, de frequência entre 0,3 a 300 GHz, que estão posicionadas entre o espectro dos raios-X e do infravermelho (figura 7). No mundo moderno, as microondas apresentam duas utilidades principais: na comunicação ou como vetores de energia. Esta última aplicação é causada pela ação direta de ondas sobre materiais capazes de converter parte das ondas eletromagnéticas absorvidas em energia térmica (MANDAL, MOHAN, HEMALATHA, 2007).

As microondas são geradas pela interação de dois campos oscilando perpendicularmente: o campo elétrico, responsável pelo calor, e o campo magnético. Para evitar interferência na comunicação por rádio, sistemas domésticos e comerciais operam em 2,45 GHz. Nessa frequência há alteração no aquecimento, por isto esta é a frequência utilizada nos fornos de microondas e corresponde ao comprimento de onda de 12,2 cm e energia de 0,23 cal/mol (KAUFMANN, CHRISTEN, 2002; LETELLIER, BUDZINSKI, 1999).

Nesta frequência as moléculas sofrem somente rotação. O componente elétrico da onda muda $4,9 \times 10^9$ vezes por segundo e, com isto, há geração de um movimento desorganizado das moléculas irradiadas pelas microondas. Esta desorganização gera aquecimento (LETELLIER, BUDZINSKI, 1999).

Ocasionalmente, os aparelhos de microondas operam em 0,915 GHz, como nos E.U.A. ou em 0,896 GHz, como na Europa (WANG, WELLER, 2006).

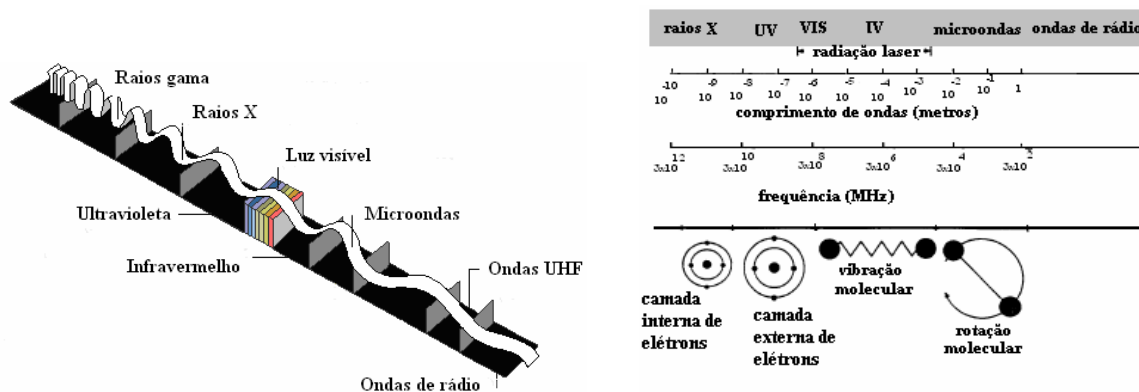
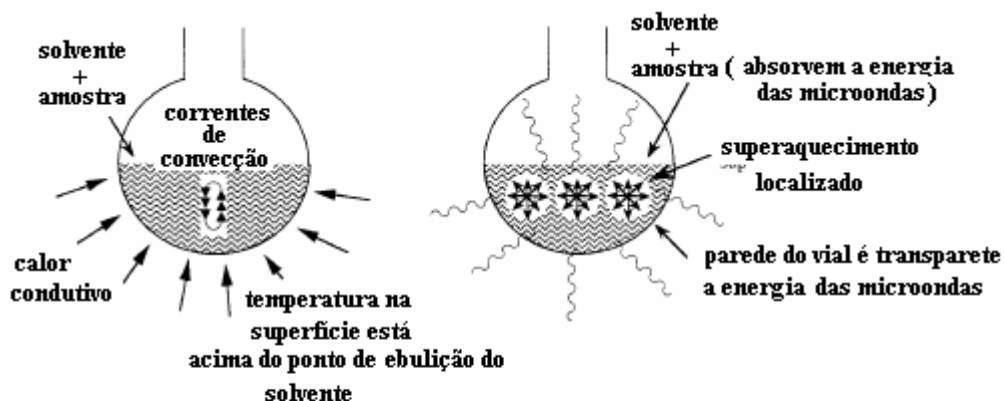


Figura 7 - Espectro eletromagnético. Fonte: KONGSTON e JASSIE, 1988.

Diferente do aquecimento convencional que depende de condução-conveccção, onde boa parte de energia é perdida para o meio, o aquecimento feito por microondas ocorre de maneira seletiva e sem perda de energia, visto que ocorre em sistema fechado (figuras 8A e 8B). Por este método pode-se reduzir o tempo de extração, quando comparado aos métodos convencionais (KAUFMANN, CHRISTEN, 2002; WANG, WELLER, 2006).



A: aquecimento convencional

B: aquecimento por microondas

Figuras 8A e 8B - Aquecimento por convecção e aquecimento por irradiação com microondas. Fonte: Neas & Collins, 1988.

Segundo Neas and Collins (1988), o princípio do aquecimento é baseado no impacto direto das microondas sobre solventes ou biomateriais polares e é governado por dois fenômenos, que em muitos casos, ocorrem simultaneamente:

- condução iônica
- rotação de dipolo

Na condução iônica ocorre a migração eletroforética de íons, sob a influência de mudança do campo elétrico. A resistência oferecida pela solução durante a migração de íons gera fricção e com isso o aquecimento.

O termo rotação de dipolos significa o realinhamento, devido ao campo elétrico, de moléculas com algum momento dipolo, induzido ou permanente, em ambos, solvente e amostra. Durante todo o tempo, as moléculas procuram alinhar-se com o campo elétrico, para manter-se na mesma fase com o campo elétrico. Como o componente elétrico da onda muda em rápida velocidade, as moléculas falham ao se realinhar e iniciam processo vibracional, que gera calor. A 2450 MHz, o realinhamento ocorre a cada $4,9 \times 10^9$ vezes por segundo, resultando em aquecimento rápido (CAMEL, 2001).

A extração por microondas depende da constante dielétrica do solvente e da matriz a ser extraída. Somente materiais dielétricos ou solventes com dipolos permanentes aquecem sob microondas. Segundo Neas and Collins (1988) a

habilidade da matéria absorver energia de microondas e passá-la para outras moléculas na forma de calor depende parcialmente do fator de dissipação.

O fator de dissipação é dado pela equação: **$\text{tang } \delta = \epsilon'' / \epsilon'$**

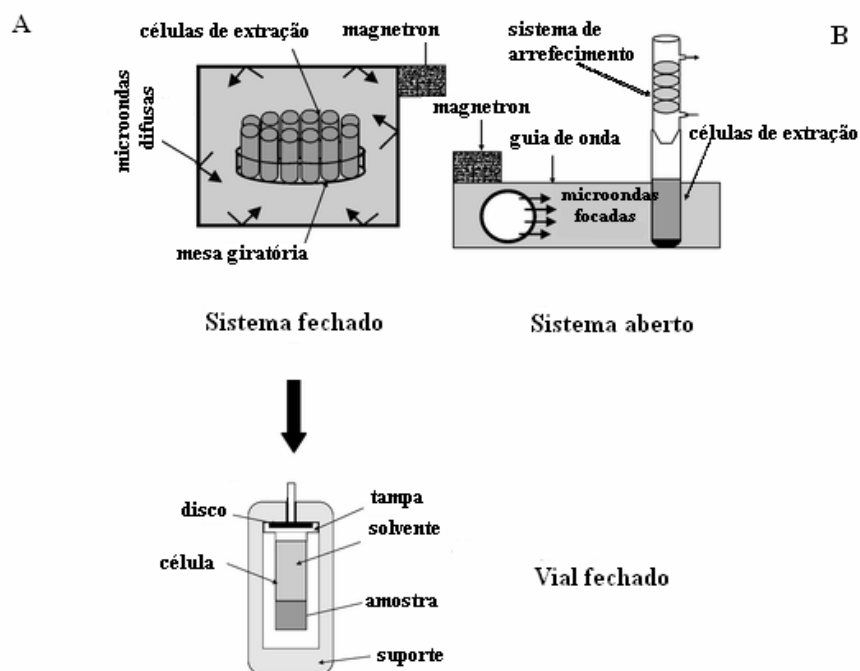
Onde ϵ'' é o fator perda dielétrica, conceituada como a medida de eficiência de conversão de energia eletromagnética em calor, enquanto ϵ' é a constante dielétrica, que é a medida da polarizabilidade de uma molécula em um campo elétrico.

Etanol e metanol absorvem menos energia que a água devido ao seu menor valor de ϵ' , mas a eficiência de aquecimento para ambos os solventes é maior que a da água, devido ao aumento de valor de $\text{tang } \delta$. Moléculas polares e soluções iônicas, usualmente ácidas, absorvem energia de microondas mais fortemente, porque tem um permanente momento dipolo, que será afetado pelas microondas. Na maioria das vezes o solvente extrator é escolhido por absorver as microondas. Solventes com altas constantes dielétricas absorvem mais energia das microondas que aqueles solventes com constante dielétricas menores. Alternativamente, as microondas podem ser absorvidas apenas pela matriz, sem aquecer o solvente. Hexano e outros solventes menos polares, como o clorofórmio, permanecem transparentes às microondas, sem sofrer aquecimento. Neste caso, somente a umidade interna da matriz, ou seja, seu conteúdo de água, gera o aquecimento e a ruptura das estruturas celulares e, por conseguinte, a liberação do conteúdo intracelular. Como o solvente que está em torno não absorve a energia das microondas, permanece resfriado, e não há degradação dos compostos termolábeis (ESKILSSON, BJORKLUND, 2000; LATELLIER, BUDZINSKI, 1999).

A aplicação de energia de microondas pode ser feita de duas maneiras: em vias fechados, sob pressão e temperatura controladas ou em vias abertos, à pressão atmosférica (figuras 9A e 9B) (KAUFMANN, CHRISTEN, 2002).

Enquanto no vial aberto a temperatura é limitada pelo ponto de ebulição do solvente à pressão atmosférica, nos vias fechados o solvente pode ser aquecido acima de seu ponto de ebulição, através de pressão apropriadamente aplicada. Neste caso, entretanto, há necessidade de esperar a temperatura cair antes de abrir o vial, levando ao aumento no tempo total gasto para a extração. Em sistemas fechados são usadas microondas difusas e o campo-elétrico não é homogêneo, por isso os vias são colocados de forma que fiquem girando dentro do aparelho.

Sistemas abertos usam microondas focadas e resultam em aquecimento homogêneo e eficiente na amostra (LETELLIER, BUDZINSKI, 1999).



Figuras 9A e 9B - Sistemas de aquecimento em vias fechados (9A) e abertos (9B). Fonte: Camel, 2001.

2.7.1 Principais elementos de um microondas

Um aparelho de microondas é constituído por 4 elementos principais:

- Gerador de microondas: magnetron, é o que gera a energia de microondas.
- Guia de onda: que é usada para propagar as microondas da fonte para dentro do forno.
- Aplicador: local de armazenamento das amostras.
- Circulador: permite que as microondas se movam somente em uma direção (KAUFMANN, CHRISTEN, 2002; LETELLIER, BUDZINSKI, 1999).

2.7.2 Extração de material vegetal por microondas

Na extração de plantas, efeitos específicos das microondas ocorrem na matriz da matéria-prima. A radiação interage seletivamente com moléculas de água livres que estão presentes nas glândulas e sistemas vasculares do vegetal. Geralmente são usadas plantas secas, mas estas também apresentam quantidades ínfimas de água. A umidade aquecida por microondas dentro da célula vegetal evapora e gera uma pressão intensa na parede celular. As altas temperaturas alcançadas pela irradiação com microondas hidrolizam as ligações éter da celulose, principal constituinte da parede vegetal (MANDAL, MOHAN, HEMALATHA, 2007). Como consequência, há um repentino aumento de temperatura não uniforme e uma rápida expansão de volume dentro do sistema. A pressão interna causa a ruptura das paredes celulares e o soluto flui livremente através do solvente, relativamente refrigerado, pelo solvente que está em volta. O fenômeno da difusão não é importante, neste caso, importante é a solubilidade dos constituintes no solvente (LATELLIER, BUDZINSKI, 1999).

2.7.3 Fatores que afetam a extração por microondas

2.7.3.1 Natureza do solvente

A escolha do solvente é fundamental para se obter uma boa extração por microondas. Esta pode ser feita com os mesmos solventes utilizados nos métodos clássicos. Entretanto, o solvente nem sempre pode ser escolhido da mesma forma, como no caso de uma extração convencional. O rendimento dependerá das propriedades dielétricas do solvente, de sua interação com a matriz e da solubilidade do analito neste solvente. Por exemplo, o hexano, como é transparente às microondas, não aquece tanto quanto o etanol e tem seu rendimento reduzido, quando comparado às técnicas clássicas. Apesar disto, é utilizado quando se deseja

extrair compostos termolábeis, como os componentes dos óleos essenciais. Como estes constituintes estão dentro do sistema vascular e glandular com alto conteúdo de umidade, as microondas irradiadas provocam rápido aquecimento interno destas estruturas, levando à ruptura celular e a liberação dos óleos essenciais. Assim, como o hexano é transparente as microondas, permanece mais resfriado, evitando a degradação (KAUFMANN, CHRISTEN, 2002).

2.7.3.2 Volume do solvente

O volume de solvente é um fator crítico e deve garantir que a matriz esteja inteiramente imersa neste solvente durante a irradiação. A quantidade de solvente necessário, em uma única amostra, é de 10-30 ml. Contudo, deve ser considerado que grandes quantidades de solvente podem ser efetivas nos métodos tradicionais de extração. Porém, na extração por microondas, grandes quantidades de solvente podem prejudicar o rendimento. Isto é devido ao fato de não haver agitação durante o processo (ESKILSSON, BJORKLUND, 2000).

2.7.3.3 Tempo de extração

Geralmente, o tempo não é um parâmetro significativo e, na maioria das vezes, 5 a 10 minutos são suficientes (LATELLIER, BUDZINSKI, 1999). Se for utilizado tempo maior não, normalmente não há aumento de rendimento. Entretanto, quando o sistema de aquecimento for fechado, são necessários mais de 20 minutos para o arrefecimento dos vias (CAMEL, 2001).

2.7.3.4 Força das microondas

Força de microondas e tempo de irradiação são dois fatores que influenciam a extração por este método. Sob forças muito altas as células se rompem abruptamente, devido às elevadas temperaturas atingidas e, conseqüentemente, o extrato apresenta maiores quantidades de impurezas. Sob forças mais moderadas, a ruptura celular pode ser feita gradualmente, melhorando a seletividade da extração (MANDAL, MOHAN, HEMALATHA, 2007).

No sistema de aquecimento que utiliza viais fechados, para a extração de compostos termolábeis, altas temperaturas causam degradação dos constituintes dos extratos; neste caso, a força escolhida durante a extração deve ser setada corretamente, ou seja, otimizada, para evitar excesso de temperatura. A força escolhida depende do número de amostras a serem extraídas em um único procedimento, pois disto depende o volume total de solvente a ser aquecido (MANDAL, MOHAN, HEMALATHA, 2007).

2.7.3.5 Características da matriz

O tamanho da partícula vegetal e o estado no qual esta se apresenta podem afetar profundamente o processo de extração. O tamanho das partículas está geralmente entre 100 µm – 2 mm. Partículas de tamanho reduzido podem melhorar a extração devido ao aumento da superfície. Isto acarreta maior contato entre matriz e solvente e aumenta a profundidade de penetração das microondas. Entretanto, partículas muito finas dificultam a separação da matriz e do solvente após a irradiação. Geralmente, são necessários processos de centrifugação e filtração para resolver o problema (ESKILSSON, BJORKLUND, 2000).

O pré-tratamento da amostra pode auxiliar na efetividade e seletividade da extração. A amostra pode ser irradiada junto com um solvente transparente às microondas e facilitar a extração de compostos termolábeis, ou pode ser pré-tratada com etanol ou água. Estes solventes são de alta capacidade de absorvência e

aquecem mais facilmente. A extração é, então, realizada através de dois mecanismos: aquecimento direto pela interação das microondas com o etanol (e/ou água) e aquecimento pela difusão do excesso de calor resultante da interação das microondas com a matriz pré-tratada. Em alguns casos, a própria umidade contida na matriz melhora o rendimento extrativo (MANDAL, MOHAN, HEMALATHA, 2007).

2.7.3.6 Temperatura

Elevadas pressões são usadas para manter os solventes em temperaturas maiores que o ponto de ebulição, à pressão atmosférica. Em sistemas fechados, a temperatura atingida está acima da temperatura de ebulição do solvente, resultando em aumento da eficiência de extração por desligamento dos analitos de sítios ativos da matriz. Além disso, os solventes apresentam grande capacidade de solubilizar os analitos em temperaturas maiores, pois a tensão superficial e a viscosidade do solvente diminuem. Em sistemas fechados, o aumento da temperatura também está associado ao aumento de pressão. Em viais abertos, a temperatura pode ser controlada através de combinações de solventes que aquecem diferentemente (MANDAL, MOHAN, HEMALATHA, 2007; HUIE, 2002; ESKILSSON, BJÖRKLUND, 2000).

2.8 Extração por fluído supercrítico (EFS)

No estado supercrítico de uma substância, a densidade é próxima àquela do estado líquido, enquanto a viscosidade é próxima àquela do estado gasoso e a difusibilidade é aproximadamente duas ordens de magnitude maior que no estado líquido típico (BRUNNER, 2004).

Por este método extrativo é utilizada a capacidade de certos compostos de se tornarem excelentes solventes para certos solutos, quando é alterada sua pressão e temperatura. O solvente se torna supercrítico quando está acima de seu ponto

crítico. Fluidos supercríticos possuem propriedades únicas, intermediárias entre aquelas de gases e líquidos, que dependem da pressão, da temperatura e da constituição do fluido (HUIE, 2002). O dióxido de carbono (CO_2), o fluido mais utilizado, devido a sua moderada temperatura ($31,3^\circ\text{C}$) e pressão crítica ($72,9 \text{ atm}$), é gasoso em temperatura ambiente. Entretanto, o CO_2 supercrítico, pela baixa polaridade, é menos efetivo para a extração de compostos com maior polaridade em fontes naturais.

No diagrama apresentado na Figura 10 é possível visualizar:

- a curva de fusão, local onde um ponto encontra-se no estado sólido e líquido em equilíbrio, C – B;
- a curva de sublimação, que contém a substância em estado de sólido-gasoso em equilíbrio, A – C;
- a curva de vaporização, que contém a substância em estado líquido-gasoso em equilíbrio, C – D;
- o ponto triplo, PT, no qual os três estados coexistem e
- o ponto crítico, PC, que está no final da curva de vaporização, onde o gás e a fase líquida se fundem para formar um único fluido homogêneo, e para além deste ponto, situa-se a região do fluido supercrítico (RAVENTOS, DUARTE, ALARCON, 2002).

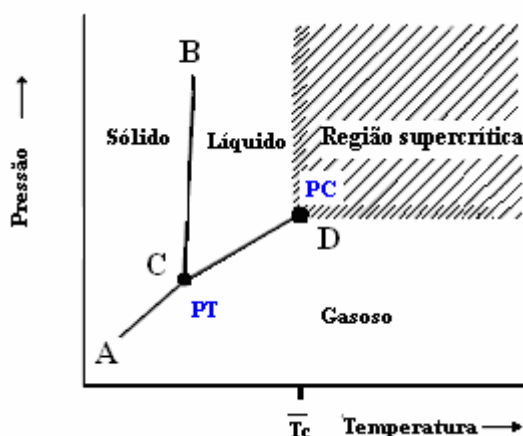


Figura 10 - Gráfico Temperatura x Pressão de uma substância pura em estado supercrítico. Fonte: Brunner, 1994.

O CO₂ é o solvente que extrai compostos com estruturas químicas semelhantes aos extraídos com solventes orgânicos convencionais. A polaridade do gás carbônico está próxima àquela do pentano e do hexano. Sendo assim, é essencialmente um solvente não-polar, mas seu poder solvente varia consideravelmente com a densidade, permitindo extrair grande variedade de substâncias, dependendo da pressão aplicada. Além disso, sua baixa temperatura crítica previne a degradação térmica dos compostos extraídos (LANG, WAI, 2001; DEL VALLE, AGUILERA, 1999).

A extração por CO₂ supercrítico é um método pouco poluente e extrai eficientemente compostos de materiais sólidos. Apresenta várias vantagens distintas, inerentes à técnica, conforme LANG e WAI, 2001:

- Os fluídos supercríticos apresentam baixa viscosidade e alta difusibilidade³ por isso podem penetrar nos poros da matriz sólida com mais facilidade que os solventes líquidos, rendendo maior transferência de massa e aumentando a velocidade de extração.
- Na extração por fluído supercrítico, um fluxo de um fluído é continuamente forçado através da amostra podendo, fornecer extração completa da droga vegetal.
- A seletividade durante a extração pode ser manipulada por variação das condições de temperatura e pressão, afetando a solubilidade de diferentes compostos no fluído supercrítico.
- Solutos dissolvidos em CO₂ supercrítico são facilmente separados por despressurização, eliminando assim o processo de concentração da amostra.
- Na extração por fluído supercrítico não são utilizados solventes orgânicos ou, quando usados como modificadores, isto é feito em pequenas quantidades.
- Processos em larga escala utilizando-se CO₂ supercrítico podem ter os resíduos minimizados, através de reutilização ou reciclagem do CO₂.
- Na extração por fluído supercrítico pode ser aplicada em diferentes escalas: analítica (menos do que um grama a poucos gramas de amostra), preparativa (centenas de gramas de amostra), escala piloto (quilos de

³ Difusibilidade de fluídos supercríticos é ~10⁻⁴ cm²/s e dos solventes líquidos ~10⁻⁵ cm²/s.

amostra) ou escala industrial (toneladas de matéria-prima, como ocorre na extração de cafeína de grãos de café).

- Pode prover informações sobre os processos e os mecanismos da extração.

A extração por fluido supercrítico é um processo simples, no qual os principais parâmetros a serem controlados são a temperatura, a pressão e a taxa do fluxo do fluido supercrítico. A figura 11 apresenta um esboço básico de uma extração por fluido supercrítico. Este sistema consiste de uma bomba de alta pressão que fornece o fluxo de CO₂ e uma célula de extração contendo a amostra, a qual é mantida sob condições ideais de pressão e temperatura. Um solvente orgânico pode ser adicionado ao sistema, utilizando uma bomba adicional ou células de pré-mistura (CAMEL, 2001).

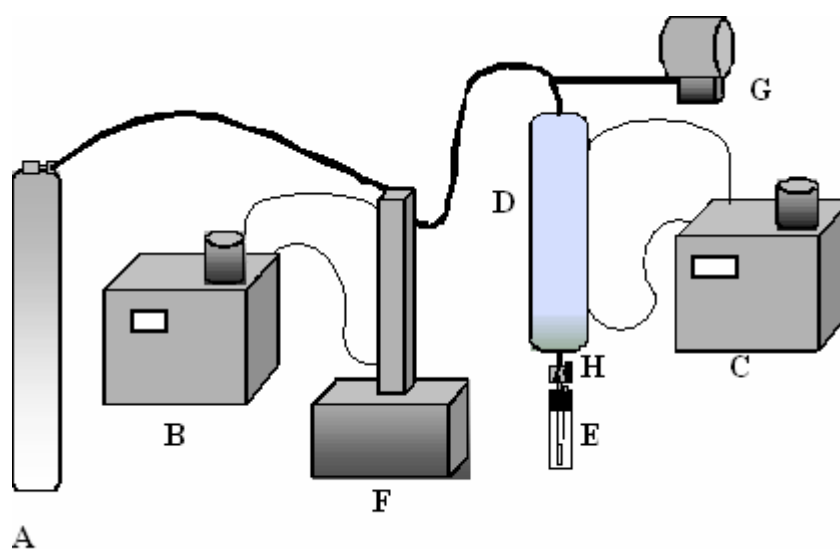


Figura 11: Esquema básico de um extrator por fluido supercrítico. A – Reservatório de CO₂ reservoir; B, C – Banhos termostatizados; D – Vial de extração; E – Vial coletor; F – Bomba de alta pressão; G – Transdutor de pressão absoluta; H – Aquecedor elétrico.

A extração de solutos presentes em matriz sólida, com o emprego de gases pressurizados, consiste na solubilização e posterior separação da mistura soluto mais o solvente. Durante o processo de extração, o solvente supercrítico escoar através de um leito fixo, constituído de partículas sólidas, dissolvendo os

componentes solúveis. O esgotamento do sólido ocorre na direção do escoamento, enquanto a massa de extrato na fase solvente aumenta na mesma direção. O solvente é alimentado no extrator e atravessa o leito fixo, carregando consigo o soluto, que na saída do extrator, é precipitado através da simples expansão do solvente (BRUNNER, 1994).

Efeitos similares ao estado supercrítico podem, em alguns casos, ser alcançados a temperaturas próximas da temperatura crítica de uma substância no estado líquido, se a pressão for maior que a pressão crítica e a temperatura for menor que a pressão crítica ($P > P_c$, $T < T_c$) (BRUNNER, 2004).

2.8.1 Uso de Modificadores

Modificadores ou co-solventes podem ser introduzidos como uma mistura de fluídos pelo sistema de bombas. Um co-solvente apresenta volatilidade intermediária entre a do fluído supercrítico e os compostos a serem extraídos. Ele é miscível com o fluído supercrítico e constitui uma pequena percentagem do total da composição do fluído. Normalmente, todos os co-solventes em condições ambientais são líquidos, mas gases também pode ser utilizados. Co-solventes podem melhorar a solubilidade e a seletividade pelo soluto, através de interações físicas com o solvente, pelo aumento da densidade, bem como pela interação química específica com os solutos. Quando se deseja conhecer o mecanismo de modificação da polaridade por adição de um modificador, é preciso conhecer a relação modificador-soluto, como por exemplo, se envolvem interações tipo dipolo-dipolo, dipolo induzido ou pontes de hidrogênio (RAVENTOS, DUARTE, ALARCON, 2002).

Adicionando modificadores é possível aumentar a polaridade do fluído supercrítico. Solventes de volatilidade intermediária como hexano, etanol e diclorometano geram forças intermoleculares que aumentam o poder do solvente, ao competir com os compostos adsorvidos nos sítios da matriz do substrato. Assim é acentuada a dependência da solubilidade em relação à temperatura, de modo que os co-solventes permitam reduzir a pressão de extração e possibilitem uma eficiente

separação soluto-solvente, apenas por alteração da temperatura (DEL VALLE, AGUILERA, 1999).

A adição de grandes quantidades de modificadores muda os parâmetros críticos da mistura (POURMORTAZAVI, HAJIMIRSADEGHI, 2007).

2.8.2 Efeito da matriz na extração por fluido supercrítico

Geralmente, o substrato sólido forma um leito fixo, através do qual o gás supercrítico escoar e extrair os componentes do substrato. Esta extração caracteriza-se como um processo em regime transiente. Nesse processo os componentes são transportados da fase sólida para a fase supercrítica. Para extração supercrítica de um substrato sólido, o sistema material vegetal+CO₂ pode ser explicado como sendo constituído por 3 componentes: o solvente; o soluto e a estrutura celulósica. A estrutura celulósica é inerte ao CO₂, mas interage fortemente com o soluto. Para plantas odoríferas, medicinais e condimentos, a porção solúvel do substrato sólido é formada de óleo resina, óleo essencial, pigmentos, várias substâncias pertencentes a várias classes de compostos orgânicos. Logo, o extrato é uma mistura complexa de substâncias químicas como terpenos, terpenóides, propanóides oxigenados e não oxigenados como ésteres, entre outros. Em geral, os solutos estão localizados dentro das células vegetais, que podem ou não sofrer ruptura, quando pré-tratadas, como através de moagem, por exemplo (RODRIGUES *et al.*, 2002).

Diferentes fatores como o tamanho da partícula, forma, área de superfície, porosidade, nível de umidade, quantidade de solutos extraíveis e a natureza da matriz afetam a extração.

O tamanho da amostra é um fator crítico porque partículas grandes podem resultar em aumento do tempo de extração, enquanto uma amostra muito pulverizada pode acelerar a velocidade de extração, mas também prejudicar a manutenção de um fluxo apropriado ou então ser varrida para fora da célula extratora (CHEMAT *et al.*, 2004).

Plantas frescas são preferidas para extração de compostos termolábeis . Entretanto, a grande quantidade de umidade pode causar dificuldades mecânicas como entupimento do sistema, devido a formação de gelo (LANG, WAI, 2001).

2.8.3 Seletividade

CO₂ pode atuar como solvente em temperaturas relativamente baixas e com parâmetros de pressão e temperatura ajustados pode realizar a extração de compostos naturais de maneira seletiva. O CO₂, por ter baixa polaridade, extrai compostos solúveis em solventes orgânicos apolares convencionais. A solubilidade dos solutos no CO₂ depende somente da combinação de efeitos entre o peso molecular e a estrutura química do substrato e varia amplamente conforme as condições de extração. Cada composto que se deseja extrair depende da pressão e da temperatura utilizada.

Compostos com grupamentos polares e alto peso molecular, apresentam solubilidade diminuída. Compostos orgânicos oxigenados de médio peso molecular como álcoois, aldeídos, cetonas, éteres e ésteres, e compostos não polares como alcanos, alcenos, terpenos de baixo peso molecular e compostos orgânicos polares, como ácidos carboxílicos, de muito baixo peso molecular são solúveis. Já ácidos graxos livres e seus glicerídeos tem reduzida solubilidade, assim como a água. O CO₂ gasoso tem poder solvente praticamente nulo, entretanto, em altas temperatura solubiliza compostos como uma extração por arraste de vapor. No estado líquido, o CO₂ no estado líquido a 0-20°C apresenta solubilidade mediana, devido a alta densidade do solvente e a baixa temperatura. No estado supercrítico, a medida que a pressão aumenta o CO₂ é capaz de separar compostos menos voláteis, de maior peso molecular, e/ou maior polaridade, como, óleos essenciais, terpenos com maior massa molecular e ésteres, ácidos graxos livres, azeites, ceras, resinas e pigmentos. Proteínas, amidos, açúcares e sais minerais são insolúveis (DEL VALLE, AGUILERA, 1999).

Monoterpenóides (C₁₀H₁₆), monoterpenóides oxigenados e sesquiterpenos (C₁₅H₂₄), diferem em peso molecular e polaridade, o que afeta sua pressão de vapor e solubilidade. Monoterpenos exibem altas pressões de vapor, por isso tem alta

solubilidade no CO₂ supercrítico. Assim, pressões de 80-90 bar e temperatura de 40-50°C são recomendadas, quando se quer seletividade (REVERCHON, 1997). Monoterpenóides oxigenados possuem ampla faixa de peso molecular e de polaridade, conforme as substituições que apresentam, resultando em amplos valores de pressão de vapor, comparáveis as dos sesquiterpenos. Isto resulta em larga distribuição de valores para a solubilidade. Sesquiterpenóides oxigenados tem, geralmente, menor pressão de vapor e solubilidade em CO₂ supercrítico. Contudo, quando a pressão de extração aumenta além de 120 bar, todos os compostos mencionados são solúveis e portanto, extraíveis (DEL VALLE, LA FUENTE, CARDARELLI, 2005).

Muitos óleos de plantas são triglicerídeos de ácidos graxos com 18 átomos de carbono. Sua solubilidade em CO₂ é dependente do peso molecular e não do grau de insaturação. Assim para a extração destes compostos, temperaturas de 40° e 226-625 bar são suficientes para extraí-los. A mesma correlação não pode ser feita para os óleos essenciais (DEL VALLE, LA FUENTE, CARDARELLI, 2005).

Dados de solubilidade podem ser usados para avaliar a possibilidade de se extrair compostos, somente em casos em que o soluto a ser extraído não tenha afinidade elevada com a matriz insolúvel. Se o composto está adsorvido na matriz sólida ou contido dentro de uma estrutura, diferentes relações de equilíbrio devem ser aplicadas. Compostos parafínicos têm solubilidade diferente dos componentes do óleo essencial; quando se apresentam juntos, os óleos essenciais são menos solúveis em CO₂ supercrítico. Ceras estão localizadas na superfície das folhas e sua função é controlar a taxa de perspiração. Os óleos essenciais estão localizados dentro das células, nos vacúolos. Para a extração de ceras e óleo essencial há diferentes métodos de transferência de massa. Ceras não apresentam afinidade com outras partes da superfície da folha, por isso são extraídas com limitada resistência à transferência de massa da fase sólida. Já o óleo essencial é completamente solúvel em CO₂ supercrítico, mas seu processo de extração caracteriza-se por maior resistência da fase sólida. Como resultado, a extração pode ser controlada por mecanismos de transferência de massa, onde a co-extração de ceras pode ser feita por separação fracionada (DEL VALLE, LA FUENTE, CARDARELLI, 2005).

Contudo, se não são os compostos voláteis a serem extraídos, deve-se aumentar a densidade do CO₂ (LANG, WAI, 2001).

2.8.4 Influencia da temperatura e pressão

A temperatura constante, um aumento de pressão provoca um aumento da densidade e, conseqüentemente, um aumento do seu poder solvente. A influência da temperatura na solubilidade é mais complexa que a da pressão. Em alta pressão, a solubilidade aumenta como aumento da temperatura quando o fluido é relativamente incompressível, solubilidade aumenta com a temperatura provocando aumento da tensão de vapor do soluto. Contrariamente, em casos de pressão intermediária, mas próximas à pressão crítica, o fluido é altamente compressível e um pequeno aumento na temperatura causa uma diminuição acentuada da densidade e, portanto, uma diminuição na solubilidade do composto (DELATTRE, 2007).

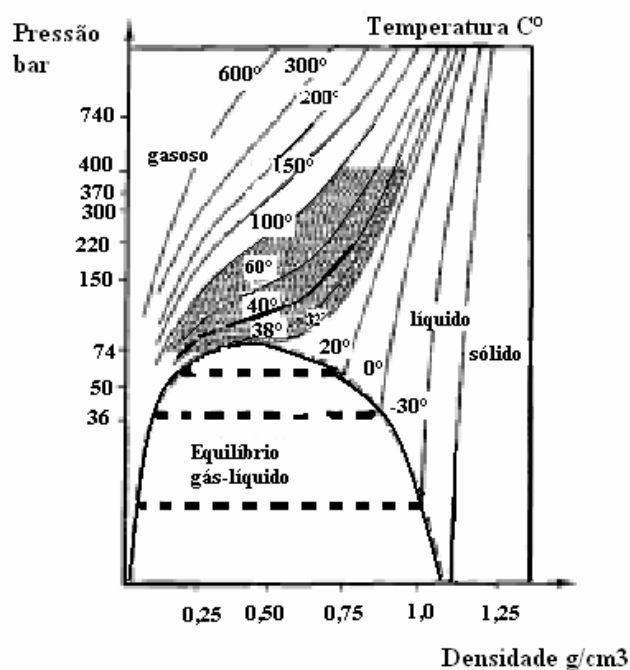


Figura 12 - Variação da densidade de CO₂, em função da pressão e da temperatura. Fonte: REID, 1987.

A solubilidade do substrato no fluido supercrítico é função da densidade do solvente e da pressão de vapor de soluto. Ao se percorrer uma isoterma com o aumento de pressão, a densidade do solvente aumenta, enquanto a pressão de vapor diminui. Por outro lado, se a temperatura for aumentada isobaricamente,

ocorre diminuição da densidade do solvente e aumento da pressão de vapor do soluto (Figura 12) (POUMORTAZAVI *et al.*, 2007).

2.9 Vantagens/ vantagens e otimização dos diferentes métodos extrativos

A literatura apresenta um resumo das vantagens e desvantagens dos diferentes métodos extrativos, resumidos no Quadro 1. O Quadro 2, apresenta estratégias para otimização da extração por fluido supercrítico e microondas, segundo CAMEL, 2001.

Quadro 1: Principais diferenças entre os métodos extrativos. Fonte: LETELLIER, BUDZINSKI, 1999; CAMEL, 2001, KAUFMANN, CHRISTEN, 2002; HUIE, 2002; WANG, WELLER, 2006.

Técnica extrativa	Extração por microondas em vials fechados	Extração por microondas em vials abertos	Extração por fluido supercrítico	Extração por soxhlet	Extração por sonicação
Descrição breve	A amostra é imersa em um solvente que absorve energia das microondas em um vial fechado, que é irradiado	A amostra é imersa em um solvente, e absorve energia das microondas em um vial aberto, que é irradiado	A amostra é colocada em um vial e extraída a altas pressões com um fluido supercrítico (geralmente o dióxido de carbono a pressões de 150-450 bar e temperaturas de 40-150°C); o analito é coletado	A amostra é colocada em um aparato de vidro e percolada repetidamente, sob aquecimento, com vapores condensados de solvente	A amostra é imersa em um solvente dentro de um frasco e colocada em um banho ultrassônico
Tempo de extração	10-30 min	10-30 min	10-60 min	3-48 h	10-60 min
Tamanho da amostra (g)	1-20 g	1-10 g	1-5 g	1-30 g	1-30 g
Volume de solvente usado (ml)	10-50	30-70	2-5	100-500	30-200
investimento	moderado	moderado	alto	baixo	baixo
vantagens	Extrações rápidas e múltiplas; pouco volume de solvente; temperaturas elevadas	Extrações rápidas; pouco volume de solvente; como opera a pressão atmosférica, é mais segura.	Extrações rápidas; volume de solvente mínimo; temperaturas elevadas; potencialmente mais seletivo; não requer lavagem, filtração	Técnica padronizada.	Extrações múltiplas

			nem concentração do extrato; automatização		
desvantagens	O solvente deve ser capaz de absorver microondas; remoção de impurezas como clorofila ou lipídios que co-extraem juntos (por ex. filtração ou centrifugação); tempo gasto no resfriamento do vial; não seletivo; risco de operar em pressões elevadas; risco de degradação térmica, principalmente conforme o conteúdo de água.	O solvente deve ser capaz de absorver microondas; remoção de impurezas como clorofila ou lipídios que co-extraem juntos (por ex. filtração ou centrifugação); tempo gasto no resfriamento do vial, não seletivo. Processa no máximo três extrações ao mesmo tempo, risco de degradação térmica, principalmente conforme o conteúdo de água.	Muitos parâmetros a otimizar, principalmente em se tratando de extração de compostos polares, a extração é altamente dependente das condições da matriz, risco de congelamento na tubulação se houver grande conteúdo de água na matriz. É automatizado, mas permite apenas uma ou duas extrações em cada ciclo.	Extração demorada; consumo de grande volume de solvente; remoção de impurezas. Não é automatizado.	Consumo de grande volume de solvente gasto; podem ser necessárias extrações repetidas; remoção de impurezas. É automatizado, mas permite apenas uma ou duas extrações em cada ciclo.

Quadro 2: Estratégias de otimização para técnicas de extração por fluido supercrítico e extração por microondas. Fonte: CAMEL, 2001.

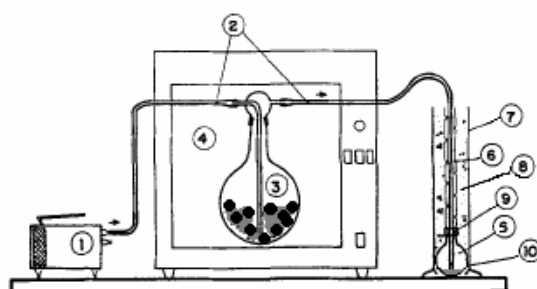
Técnica		Parâmetro	Efeito observado	Estratégia de otimização
Extração por fluido supercrítico	Natureza dos solutos	Apolar	Problemas de solubilização	CO ₂
		Moderadamente polar ou polar	Problemas de solubilização	CO ₂ + solvente orgânico, outros fluídos
		Iônico	Problemas de solubilização	CO ₂ + reagente: pareamento de íons, complexação, derivatização.
	Parâmetros de extração	Pressão	Solubilização	Aumento de pressão
		Temperatura	Desorção, difusão	Aumento de temperatura
		Tempo	Duração da extração	Aumento do tempo de extração
	Natureza da matriz	Partículas grandes	Diminuição da taxa de extração, diminuição do rendimento	Melhora da moagem da matriz
		Sítios ativos	Soluto adsorvido na matriz	Adição de um modificador
		Conteúdo de água	Água entranhada na matriz, diminuição do rendimento	Secagem ou adição de um agente secante
	Extração por microondas	Natureza dos solutos	Apolar ou polar	Problemas de solubilização
Parâmetros de extração		Temperatura	Problemas de solubilização, desorção, difusão	Aumento de temperatura

		Tempo	Duração da extração	Aumento do tempo de extração
	Natureza da matriz	Partículas grandes	Diminuição da taxa de extração, diminuição do rendimento	Melhora da moagem da matriz
		Conteúdo de água	Superaquecimento, diminuição do rendimento	Secagem ou adição de um agente secante

2.10 Métodos extrativos de plantas medicinais: um enfoque sobre os métodos empregados na pesquisa com *Lippia sidoides*.

2.10.1 Extração por microondas de *L. sidoides*.

Um forno de microondas doméstico foi adaptado por CRAVEIRO, MATOS, ALENCAR, 1989, como objetivo de extrair óleo essencial da planta fresca sem adição de água nem solvente através de extração por microondas. Trabalhando com quantidades de 30-40 g de planta fresca a extração foi bem sucedida após 5 min de irradiação em potência máxima.



- (1) Bomba de ar
- (2) Tubulação de teflon
- (3) Balão de de fundo redondo coberto com tampa 24/40
- (4) Forno de microondas
- (5) Balão de fundo redondo de 50 ml
- (6) Condensador
- (7) Cilindro de 1 L graduado
- (8) Mistura sal + gelo
- (9) Selo de teflon
- (10) Água destilada + óleo essencial

Figura 13 - Forno adaptado por Craveiro, Matos, Alencar, 1989, para extração por microondas.

A mistura óleo/água foi obtida com diclorometano em funil de separação, o óleo extraído pelo equipamento, após análise por CG-EM, não foi diferente qualitativamente do óleo extraído por arraste de vapor, embora estes apresentassem diferenças significativas em relação às percentagens de cada componente. A quantidade total de material extraído e o tempo de extração foram drasticamente reduzidos (CRAVEIRO, MATOS, ALENCAR, 1989).

2.10.2 Extração por fluido supercrítico de *L. sidoides*

Três métodos extrativos usados na obtenção de extratos de folhas de *L. sidoides* foram comparados por SOUSA *et al.*, 2002: a extração com CO₂ pressurizado, ou seja, próximo do ponto supercrítico, arraste de vapor e extração com etanol pelo método de Povh. Neste trabalho, foi avaliada a solubilidade do óleo essencial de *L. sidoides* pelo método dinâmico. Foram utilizados como parâmetros pressões de 66,7 e 77,5 bar, nas temperaturas de 10, 15, 20, 22 e 25°C.

Nos experimentos de Sousa e colaboradores, foi pesquisado o Q*, que é o fluxo de solvente no qual este está saturado pelo soluto. A maior transferência de massa ocorreu na pressão de 66,7 bar e na temperatura de 15°C com um fluxo (Q*) de $1,5 \times 10^{-5}$ kg/s. Com fluxo abaixo deste valor, o rendimento foi menor porque houve efeito de dispersão axial, e quando o fluxo encontrava-se acima deste valor, o rendimento também caiu, pois o tempo de contato com o solvente foi menor. Assim, em fluxo de $1,5 \times 10^{-5}$ kg/s o extrato apresentou maior solubilidade nos parâmetros utilizados durante esta extração. As variações das propriedades termofísicas foram relativamente pequenas devido ao estreito intervalo entre temperatura e pressão utilizadas. A pressão de vapor do soluto aumentou com a temperatura, causando aumento de solubilidade. Alta solubilidade foi observada em 66,7 bar numa faixa de 15-20°C. Com essa variação de 5 graus de temperatura (de 15 a 20°C) a solubilidade aumentou 14%. Entretanto, o mesmo aumento de temperatura, mas de 20 a 25°C, resultou em uma redução na solubilidade de 42%. Devido os autores, no primeiro caso, se sobressaiu o efeito da pressão de vapor do soluto e no segundo caso predominou o efeito de densidade do solvente.

Quando o extrato obtido por CO₂ pressurizado foi comparado com o extrato obtido por hidrodestilação e por extração com etanol, através de CG-EM, foi constatado que os extratos apresentavam perfis semelhantes. A análise por cromatografia gasosa do extrato obtido por fluido supercrítico apresentou: timol (48,32%), 1,8-cineol (8,62%) e carvacrol (6,90%).

O rendimento total dos processos extrativos foram maior, na ordem: extração com CO₂ > hidrodestilação > extração por etanol. O conteúdo de timol foi maior no caso da extração com etanol, seguindo-se a extração por CO₂ pressurizado e, na

seqüência, a por arraste de vapor. O conteúdo de sesquiterpenóides manteve a proporção para a extração com CO₂ pressurizado e hidrodestilação, mas foi menor na extração por etanol. Entretanto, os monoterpenóides apresentaram-se em maior quantidade no macerado que nos outros dois extratos (SOUSA, *et al.*, 2002).

3 MANUSCRITO 2

Antibacterial activity of extracts of *Lippia sidoides* Cham. obtained by different methods

Viviane de Oliveira Garcia ^a, Simone Cristina Benovit ^a, Luiz Gustavo Brenner Reetz ^b, Rosmari Hörner ^b, Diogo Pompéu de Moraes ^c, Fábio Andrei Duarte ^c, Érico Marlon de Moraes Flores ^c, José Vladimir de Oliveira ^d, Ana Maria Soares Pereira ^e, Berta Maria Heinzmann ^{a,*}

^aDepartamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 26, Campus Universitário, Avenida Roraima nº 1000, Bairro Camobi, 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

^bDepartamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

^cDepartamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

^d Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada, Av. Sete de Setembro, 1621, 99700-000 Erechim, Rio Grande do Sul, Brazil

^eUnidade de Biotecnologia, Universidade de Ribeirão Preto, Av. Constabile Romano, 2201, Ribeiranea, 14100-000, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

Abstract

In this work, we compared seven different extracts obtained from the aerial parts of *Lippia sidoides* Cham. against Gram-positive and Gram-negative strains in order to define the best extraction method to optimize the medicinal use of this plant as an antibacterial agent. Extracts obtained by maceration (MC), soxhlet extraction (SX), ultrasound-assisted extraction (UB; UH), microwave-assisted extraction (MAE) and supercritical fluid extraction (SFE) were compared according to their antimicrobial activity, yield, and solvent/time consumption. Significant differences among the extraction methods were observed in the analysis. SFE furnished the most active extract and it was therefore analyzed by CG-MS.

Key words

Lippia sidoides Cham., antibacterial activity, extraction methods.

* Corresponding author. Phone: +55 55 3220 9366 Fax: +55 55 3220 8248. E-mail address:

1 Introduction

According to the World Health Organization (WHO), about three-quarters of the world population relies upon traditional remedies (mainly herbs) for their health care [1]. Additionally, the WHO recognizes the importance of medicinal plants to the health systems of many developing countries [2].

Lippia sidoides Cham. (Verbenaceae), commonly known as alecrim-pimenta, is one of the medicinal plants that is presently being considered for inclusion in the phytotherapy program of Brazil's National Health System. This species, which grows prevalently in caatinga region, in northeast of Brazil, has played an important role as antiseptic agent in traditional medicine in this region and is used as tinctures, liquid soap, tisane, toothpaste and mouthrinse [3]. Other studies have described its antimicrobial activity which presents a wide-spectrum and has been related to a high content of thymol and carvacrol in the essential oil. Nevertheless, the antimicrobial activity presented by some ethanolic crude extracts of *L. sidoides* indicates that this species also contains polar active compounds [4, 5]. The extraction of active constituents is generally performed by maceration and soxhlet apparatus, while the essential oil is generally obtained by hydrodistillation. These methods are often time-consuming and require large volumes of organic solvents. Moreover, many natural products could originate artifacts during the extraction by hydrodistillation and soxhlet apparatus since they are thermally unstable or undergo to hydrolysis among other chemical degradation reactions [6].

In this study, modern procedures of extraction were compared with conventional solid liquid extraction methods from the aerial parts of *Lippia sidoides* in terms of extraction time, yields, solvent consumption and antimicrobial activity. The chemical analysis of the most

active extract was performed by gas chromatography with mass spectrometric detection (GC-MS) in order to determine its chemical composition.

2 Experimental

2.1 General

Plant material was pulverized at 600 μm or crushed manually and extracted with ethanol 98%, except for SFE. For the ultrasonic assisted extractions, the glass flasks containing the plant material with the solvent are submitted to manual agitation each 20 min.

All extraction procedures were performed in triplicate. After the extraction procedures, extracts were filtered, concentrated under reduced pressure and weighted to determine the extraction yields. Extraction time, temperature, and solvent volume/sample weight ratio (ml/g) of the different methods are described in Table 1.

2.2. Plant material

Aerial parts of *Lippia sidoides* Cham. were collected in Terra de Ismael, Jardinópolis, São Paulo (21° 04' 108" latitude S, 47° 44' 0,71" longitude W" at 547 m), in May 2008. The species was identified by Fátima G. Salimena (University of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil). A voucher specimen is deposited in the Biotechnology Department of the University of Ribeirão Preto under the number 1328.

2.3 Extraction methods

2.3.1 Conventional extraction procedures

As conventional extraction methods, maceration and soxhlet apparatus were used. In maceration, plant material was coarsely cut and extracted in a 1000 ml amber flask for 3 times 7 days, under occasional agitation. For the extraction using soxhlet, pulverized aerial parts were placed into apparatus, which was connected with a round-bottom flask.

2.3.2 UB

Ultrasound-assisted extraction was performed in an Ultrasonic Cleaner 1440D working at frequency of 40 KHz.

2.3.3 UB and UH

For extractions using ultrasonic bath (UB), we used a 40 kHz and 100 W of nominal power ultrasonic processor, Ultrasonic Cleaner 1440D Model.

For the extractions with ultrasonic horn (UH 130 and UH 750), two equipments operating at 20 kHz with nominal power of 130 and 750 W (Model VCX 130 PB and VC 750, respectively) were used. The ultrasonic amplitude was set at 40 and 70% for Model VCX 130 PB and VC 750, respectively. The experiments were performed in a 250 ml three-neck conic glass reactor, using an ice bath for cooling. Horns were directly immersed into the mixture.

2.3.4 MAE

A microwave sample preparation system (Multiwave 3000 model) equipped with high-pressure quartz vessels (internal volume of 80 ml) maximum temperature and pressure of 280°C and 80 bar, respectively, was used. Vessels containing the plant material with the solvent (Table 1) were closed and heating program of the microwave oven was applied: 300 W for 5 min (ramp of 5 min) and 0 W for 20 min for cooling. The maximum temperature and pressure were set at 100 °C and 50 bar, respectively.

2.3.5 SFE

The experiments were performed in a laboratory scale unit. The equipment consists basically of a CO₂ reservoir, two thermostatic baths, a syringe pump (ISCO 260D), a 0.1dm³ jacketed extraction vessel, an absolute pressure transducer (Smar, LD301) equipped with a portable programmer (Smar, HT 201) with a precision of + 0.12 bar, a collector vessel with a glass tube and a cold trap. The powder aerial parts were charged into the extraction vessel. CO₂ (99.9% purity) was pumped into the bed, which was supported by two 300 mesh wire disks at both ends, and was kept in contact with the herbaceous matrix for at least one hour to allow the system stabilization. Afterwards, micrometering valve was open for extract collection and the CO₂ mass flow was accounted for the pump recordings. The experiments were accomplished isothermally, at constant pressure (table 1) and at CO₂ flow rate of 2ml min⁻¹.

2.4 Antibacterial assay

The antibacterial activity of the extracts was assayed by the broth microdilution method as established by M7-A6 NCCLS [7, 8] for bacteria. Assays were performed in triplicate. The tested microorganisms included cataloged strains (Table 2) and clinical isolates (Table 3). Clinical isolates were obtained from the University Hospital of Santa Maria. Ampicilin was used as positive control (concentrations of 5000-0.05 $\mu\text{l/ml}$).

2.5 Statistical analysis

Yield data were transformed in $\text{arc sen } \sqrt{x/100}$. Statistical analyses of the yield and antibacterial activities of the extracts (concentrations 5000-9.7 $\mu\text{l/ml}$) were performed using post hoc Mann-Whitney's test following by Kruskal-Wallis test. A significance level of 5 % was considered ($P < 0.05$) in all cases.

2.6 Thin layer chromatographic detection of thymol

Toluene : ethyl acetate (95:5) were used for the TLC development. For the detection of thymol, different extracts were applied on silica gel 60 F₂₅₄ plates (10 x 20 cm, 0,2 mm). The standard and the samples were diluted in ethanol in concentrations of 10 mg/ml and 50 mg/ml, respectively. Next, 10 μl of each solution was transferred on the start line. The detection with UV-light at 254 nm was performed before and after spraying with anisaldehyde sulfuric. Thymol was identified as red spot (R_f 0,42).

2.7 SFE Analysis

Extracts were analyzed with a gas-chromatograph interfaced with a mass selective detector – GC/MSD (Shimadzu, Model QP 5050A). conditions of analysis: capillary column DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm); He at the flow rate of 1 ml min⁻¹; split mode (split ratio 1:20); temperature gradient program: 60°C (4min); 60°C up to 100°C (5 min); 100°C up to 160°C (2,5 min); 160°C up to 300°C (7 min) and 300°C (5 min); interface temperature: 310°C. MS: electronic impact, 70 eV. The components were identified on the basis of their retention indices relative to those of an homologous series of *n*-alkanes (C₈-C₃₂) and their mass spectral fragmentation pattern, which were compared with those reported in the literature and stored in the used MS Library [9, 10].

3. Results and discussion

Time and solvent consumption data as well as temperature and yield of the seven extraction procedures are shown in Table 1. Figure 1 compares the yield percentages of the different procedures.

<Table 1>

<Figure 1>

Results showed that the extraction by soxhlet presented the highest yield (26.3%) whereas SFE gave the lowest one (1.37%). MAE extraction also showed a good yield, with 15.9% of residue mass followed by maceration (13.5). MAE works at elevate temperatures and pressures, which drastically improve the speed of the extraction process. The direct interaction of the microwaves with the water molecules occurring in the glands and vascular

systems results in the subsequent rupture of the plant tissue and the release of the active compounds into the organic solvent [11].

Considering time consumption, MAE demanded shorter time period for the extraction itself, although the time needed for the filtration process was greater due to the amount of impurities, as described by Wilga et al., 2007 [12]. However, additional time was spent to remove the extractor vials thus it was necessary to wait at least 20 min for cooling. Maceration did need the highest consumption of time and solvent; therefore a greater time for the filtration was spent. Ultrasound methods both bath and horn needed the same time for extraction. The amount of raw material and solvent varied according to the capacity of the equipment; however, the proportion drug/solvent of 1:10 was maintained. SFE spent less time and acceptable amount of solvent, since CO₂ is nontoxic dispensing the filtration and evaporation stages and saving energy as well [13, 14]. However, this extraction method showed the lowest yield.

Considering the antimicrobial activity, both Tables 2 and 3 show that SFE extract was in general the most effective in inhibiting bacterial growth of Gram-negative and Gram-positive bacteria. The slowest yield, presented together with the results of the antimicrobial evaluation, indicated that a selective extraction of the active substances in this case likely occurred. Conversely, extracts obtained by Soxhlet and MAE were in general less active against the most stains assayed. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were used as models for Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively, and both showed the same value of minimal inhibitory concentration (MIC), when incubated with SFE (0.62 mg/ml). Nevertheless, when compared with the classical methods SFE did not present a better activity against *S. aureus*, whereas MRSA presented the same MIC values for SFE and extraction with ultrasonic horn (0.62 mg/ml). For all other bacterial strains SFE presented the best MIC values (Tables 2 and 3). *B. cereus* and *A. baumannii* showed the best results of MIC and MBC values when incubated with SFE. Surprisingly, the typified strain of *B. cereus* furnished the same values of MIC and MBC for all extracts, except for MAE. Although the clinical isolate of *B. cereus* has shown MIC value of 0.16 mg/ml in the assays with SFE, it did not present bactericidal activity, suggesting bacterial resistance (Tables 2 and 3).

Considering MBC values, we observed that *P. aeruginosa*, a Gram-negative bacterium, was not killed by any extract, except by SFE, which showed bactericidal activity at the concentration of 2.50 mg/ml.

<Table 2>

<Table 3>

The chemical composition of an extract of *L. sidoides* obtained by pressurized carbon dioxide (66.7 / 78.5 bar and 10-25°C) is described in the literature [15]; however, its antimicrobial activity has never been reported. By TLC analysis, thymol could be detected in all extracts obtained. Results indicated that the extraction of thymol was possible through all methods used, including methods that undergo high temperature such as soxhlet and MAE extractions. Since CO₂ is an apolar solvent and SFE was the most effective inhibiting bacterial growth, we have analyzed them by CGMS. As showed in Table 4, SFE was characterized by large amounts of oxygenated terpenes (69%) and sesquiterpene hydrocarbons (17%). The extract also contains small amounts of oxygenated sesquiterpenes (6.3%) and traces of large chain hydrocarbons.

In FSE, the main constituents were thymol (36%), carvacrol (31%) and Z-caryophyllene (9.37%) while the remaining components were present as minor or trace constituents. Thymol is an antifungal and antibacterial agent used in topical antiseptic and analgesic preparations in concentrations ranging from 0.1-1% in personal care products [16].

<Table 4>

A similar composition, as showed in Table 4, was described by Botelho et al. [17] for the essential oil obtained by hydrodistillation. In general, the composition of the essential oil obtained by steam distillation cannot be compared with the volatile fraction of SFE extract because certain components of the volatile oil tend to hydrolyze, whereas other constituents are decomposed by high temperature [6]. In SFE, despite the use of high temperature, the process is 3-4 folds quicker than steam distillation [17].

Although Sousa et al. [15] have reported the extraction of the aerial parts of *L. sidoides* by pressurized carbon dioxide, the percentage composition was different from the results obtained at this work, since the authors found 48.32% of thymol, followed by Ecaryophyllene (13.77%) and carvacrol (6.9%). Moreover, the authors performed the comparison among pressurized carbon dioxide extraction, steam distillation process, and ethanol extraction. Thymol was detected as major compound in all extracts, whereas carvacrol was present in small quantities (bellow 10%). This can be related to the geographic region of growth, soil conditions, and growth technique used.

Di Pasqua et al. [18] studied the effects of the main two compounds detected in SFE in isolated form, and observed that sublethal concentrations of thymol and carvacrol promote changes in the membrane fatty acid composition as response to adaptative stress suffered by

the microorganisms, which leads to the modulation of the membrane fluidity. Previous studies were performed to detect potassium release from cells as the first indication of membrane damage as well as to determine MIC values, using thymol against *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*. MIC values ranged from 500 to 1000 µg/ml except to *P. aeruginosa*, which showed no susceptibility for the tested substance; however, the authors described potassium loss [19]. Cox and Markham [20] evaluated several *P. aeruginosa* strains, which presented intrinsic resistance to biocides by microdilution assay using carvacrol. Although the results show that the *P. aeruginosa* strains used were less susceptible than *E. coli*, carvacrol was able to damage the cell wall. An additional work describes the antimicrobial efficacy of thymol and carvacrol against *S. aureus* ATCC 6538P (0.31 mg/ml and 1.25 mg/ml, respectively) and *E. coli* ATCC 15221 (5.0 mg/ml and 2.5 mg/ml, respectively). The authors postulate that the antimicrobial activity of these compounds may result from the perturbation of the lipidic fraction of microorganism plasmatic membrane, resulting in alterations of its properties. Moreover, the compounds also penetrate into the interior of the cell and interact with intracellular sites critical for antibacterial activity [21].

Among the extraction methods used, SFE shows to be the best one. Although it shows the lowest yield at the employed conditions, this method presents advantages as the possibility to control different parameters such as the temperature and pressure of the process and also time/solvent consumption allowing the optimization of the yield. Moreover, there is reduction of waste, reduction of energy consumption and substantial antimicrobial activity, since SFE was the most active of the 7 extracts tested against *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *E. coli*, *A. baumannii*, *S. marcescens*, *K. pneumoniae* and *S. epidermidis*. Results indicate that the polar constituents of *L. sidoides* play a minor role regarding its antimicrobial activity and show that the use of this clean production technology/approach for the extraction of this species allows the obtainment of an improved product. The comparison of the antimicrobial activity detected for this extract with literature data indicates that SFE presents an antimicrobial activity closely together with the isolated main compounds, and could therefore be considered the best method of extraction of *L. sidoides* in order to optimize the antimicrobial activity of derived phytotherapeutic products.

References

- [1] WHO, Report on the intercountry expert meeting of traditional medicine and primary health care, WHO-EMTRM/1-E/L/12.92/168, Cairo, Egypt, 1991.
- [2] WHO/IUCN/WWF, Guidelines on the conservation of medicinal plants (ISBN 2 8317 0136 8), IUCN, Gland, Switzerland, 1993.
- [3] F.J.A. Matos, F.F. Oliveira. *Lippia sidoides* Cham. – pharmacognosy, chemistry and pharmacology. Cham. Rev. Bras. Farm. 79 (1998) 84- 87.
- [4] T.L.G. Lemos, F.J.A. Matos, J.W. Alencar, A.A. Craveiro, Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants, *Phytother. Res.* 41(990) 82-84.
- [5] R.O.S. Fontenelle, S.M. Morais, E.H.S. Brito, M.R. Kerntopf, R.S.N. Brilhante, R.A. Cordeiro, A.R. Tomé, M.G.R. Queiroz, N.R.F. Nascimento, J.J.C. Sidrim, M.F.G. Rocha, Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham., *J. Antimicrob. Chemother.* 59 (2007) 934-940.
- [6] I. Prosser, A.L. Phillips, S. Gittings, M.J. Lewis, A.M. Hooper, J.A. Pickett, M.H. Beale, (+)-(10*R*)-Germacrene A synthase from goldenrod, *Solidago canadensis*; cDNA isolation, bacterial expression and functional analysis, *Phytochemistry*, 60 (2002) 691-702.
- [7] NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria that grow aerobically, Approved Standard M7-A6, 6th ed., Wayne, NCCLS. 2003.

[8] R.A.N. Deuschle, T. Camargo, L.N. Francescato, S.H. Alves, B.M. Heinzmann, Antimicrobial activity of *Senecio desiderabilis* Vellozo (Asteraceae), *Acta. Farm. Bonaerense* 25 (2006) 356-359.

[9] <http://webbook.nist.gov/chemistry/>, accessed at 02. June 2009.

[10] R.P Adams RP. Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectrometry Academic Press Inc., San Diego, 2001.

[11] M. Letellier, H. Budzinski, Microwave assisted extraction of organic compounds, *Analysis* 27 (1999) 259-271.

[12] J. Wilga, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, Comparison of extraction techniques of robenidine from poultry feed samples, *Talanta* 73 (2207) 812-819.

[13] L. Wang, C. L. Weller, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends Food Sci. Technol.* 17 (2006) 300-312.

[14] Q. Lang, C.M. Wai, Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies – a practical review, *Talanta*, 53 (2001) 771-782.

[15] E.M.B.D. Sousa, O. Chiavone-Filho, M.T. Moreno, D.N. Silva, M.O.M. Marques, M.A.A. Meireles, Experimental results for the extraction of essential oil from *Lippia sidoides* Cham, using pressurized carbon dioxide, *Braz. J. Chem. Eng.* 19 (2002) 229-241.

- [16] J.E. Robers, M.K. Speedie, V.E. Tyler. Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology, Williams & Williams, Baltimore, 1996.
- [17] M. A. Botelho, N.A.P. Nogueira, G.M. Bastos, S.G.C. Fonseca, T.L.G.Lemos, F.G.A. Matos, D. Montenegro, J. Heukelbach, V.S. Rao, G.A.C. Brito, Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens, Braz. J. Med. Biol. Res. 40 (2007) 349-356.
- [18] R. Di Pasqua, N. Hoskins, G. Betts, G. Mauriello, changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media, J. Agric. Food Chem. 54 (2006) 2745-2749.
- [19] S.E. Walsh, J.-Y. Maillard, A.D. Russell, C.E. Catrenich, D.L. Charbonneau, R.G. Bartolo, Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. J. Appl. Microbiol. 94 (2003) 240–247.
- [20] S.D. Cox, J.L. Markham. Susceptibility and intrinsic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to selected plant volatile compounds, J. Appl. Microbiol. 103 (2007) 930–936.
- [21] M.T. Cristani, M. D'Arrigo, G. Mandalari, F. Castelli, M.G. Sarpietro, D. Micieli, V. Venuti, G. Bisignano, A. Saija, D. Trombetta, Interaction of Four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity J. Agric. Food Chem. 55 (2007) 6300-6308.

Table 1

Experimental conditions and extract yield of different extracts of *Lippia sidoides* Cham.

Method	Time consumption (min)	Extraction temperature(C°) / pressure (bar)	Solvent (ml)	Plant material / solvent	Plant material in g (± SD)	Yield in mg* ((± SD)
MC	30240 ^a	AR/AR	EtOH (2300)	1/22	104.3 (0.70)	14.1 (0.30)
SX	1800 ^a	78/AR	EtOH (250)	1/4	66.8 (11.59)	17.6 (3.27)
UB	60 ^a	36-41/AR	EtOH (250)	1/10	25.1 (0.03)	2.5 (0.09)
UH130	60 ^a	10-20/AR	EtOH (125)	1/10	12.5 (0.02)	0.9 (0.10)
UH750	60 ^a	13-44/AR	EtOH (100)	1/10	10.1 (0.02)	1.1 (0.04)
MAE	5 ^a +20 ^b	80/10.5	EtOH (50)	1/10	5.0 (0.01)	0.8 (0.08)
SFE	90 ^a	50/150	CO ₂ (180)	1/10	22.2 (0.27)	0.3 (0.07)

MC: maceration, SX: extraction by soxhlet, UB: extraction by ultrasound bath, UH: extraction by ultrasound with horn (130 and 750 W), MAE: microwave-assisted extraction, SFE: supercritical fluid extraction, a: mean values, b: cooling time, AR: at room, CO₂: solvent consumption in

supercritical fluid extraction, ETOH: consumption of ethanol, * The data are represented as means. All means are statistically different, Mann-Whitney test, $p \leq 0,05$.

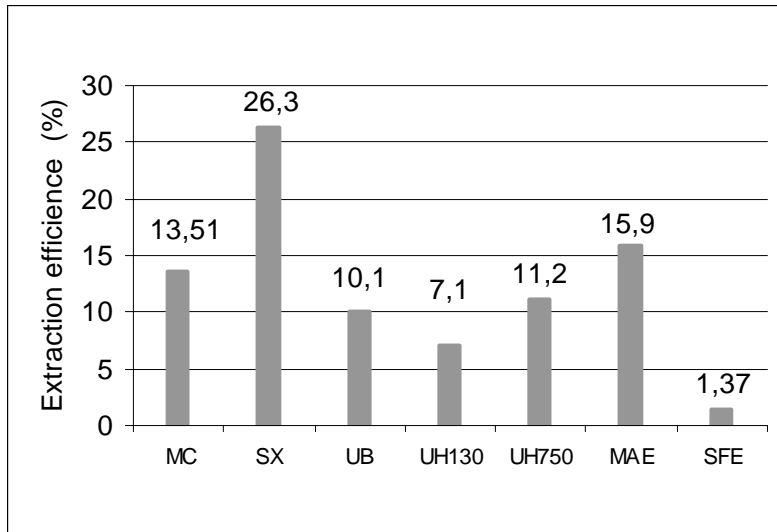


Figure 1: Yield of the different extraction methods.

Table 2

Antibacterial activity of different extracts of *Lippia sidoides* Cham. against typified strains (MIC/MBC in mg/mL).

	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> . ATCC 27853	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
MC	1.25 ^b / 1.25 ^c	NA	0.62 ^d / 1.25 ^c	2.50 ^b / 2,50 ^b
SX	1.25 ^b / 1.25 ^c	NA	0.62 ^d / 1.25 ^c	2.50 ^b / 5.00 ^a
UB	2.50 ^a / 2.50 ^b	NA	2.50 ^a / 2.50 ^b	2.50 ^b / 2.50 ^b
UH130	2.50 ^a / 2.50 ^b	NA	0.63 ^c / 1.26 ^c	2.50 ^b / 5.00 ^a
UH750	2.50 ^a / 2.50 ^b	NA	1.25 ^b / 5.00 ^a	5.00 ^a / 5.00 ^a
MAE	1.25 ^b / 5.00 ^a	NA	2.50 ^a / 2.5 ^b	5.00 ^a / 5.00 ^a
SFE	0.31 ^c / 0.31 ^d	2.50 ^a / 2.50 ^a	0.62 ^d / 0,62 ^d	0.62 ^c / 2.50 ^b
AM	0.008 / 0.03	1.00 / >1.00	0.0004 / >0.05	0.004 / >1.00

Means followed by same letter in the columns, did not differ from each other (Mann-Whitney test, $p \leq 0,05$). ATCC, it strains purchased from the American Type Culture Collection; NA, no activity up to 5.00 mg/ml; AM, ampicilin. Results are recorded as means of three readings. MC: maceration, SX: extraction by soxhlet, UB: extraction by ultrasound bath, UH: extraction by ultrasound with horn (130 and 750 W), MAE: microwave-assisted extraction, SFE: supercritical fluid extraction.

Table 3

Antibacterial activity of different extracts of *Lippia sidoides* Cham. against clinical isolates (MIC/MBC in mg/mL).

	<i>Bacillus cereus</i>	MRSA	<i>Escherichia coli</i> .	<i>Acinetobacter baimannii</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> .
MC	1.25 ^c / NA	1.25 ^b / 1.25 ^c	1.25 ^b / 5.00 ^a	1.25 ^c / 2.50 ^b	2.50 ^b / 2.50 ^b	2.50 ^a / 2.50 ^b	1.25 ^b / 2.50 ^a
SX	5.00 ^a / NA	2.50 ^a / 2.50 ^a	2.50 ^a / 5.00 ^a	5.00 ^a / 5.00 ^a	5.00 ^a / 5.00 ^a	2.50 ^a / 5.00 ^a	1.25 ^b / 2.50 ^a
UB	2.50 ^b / NA	2.50 ^a / 2.50 ^a	1.25 ^b / 2.50 ^b	1.25 ^c / 1.25 ^c	2.50 ^b / 5.00 ^a	2.50 ^a / 5.00 ^a	1.25 ^b / 2.50 ^a
UH130	1.25 ^c / NA	0.63 ^c / 1.26 ^b	1.26 ^b / 2.52 ^b	2.50 ^b / 2.50 ^b	250 ^b / 5.00 ^a	2.50 ^a / 2.50 ^b	1.25 ^b / 2.50 ^a
UH750	2.50 ^b / NA	0.63 ^d / 2.50 ^a	1.25 ^b / 5.00 ^a	2.50 ^b / 2.50 ^b	5.00 ^a / 5.00 ^a	2.50 ^a / 5.00 ^a	1.25 ^b / 2.50 ^a
MAE	1.25 ^c / NA	1.25 ^b / 2.50 ^a	2.51 ^a / 5.00 ^a	2.50 ^b / 2.50 ^b	5.00 ^a / 5.00 ^a	2.50 ^a / 5.00 ^a	2.50 ^a / 2.50 ^a
SFE	0.16 ^d / NA	0.62 ^d / 1.25 ^c	0.62 ^c / 2.50 ^c	0.16 ^d / 0.16 ^d	1.25 ^c / 1.25 ^c	1.25 ^b / 2.50 ^b	0.62 ^c / 2.50 ^a
AM	0.004 / >1.00	0.03 / 1.00	NA / NA	NA / NA	0.032 / >1.00	0.004 / >1.00	0.06 / 0,250

Means followed by same letter in the columns, did not differ from each other (Mann-Whitney test, $p \leq 0,05$). M.R.S.A.: Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*; NA, no activity up to 5.00 mg/ml; AM, ampicilin. Results are recorded as means of three readings. MC: maceration, SX: extraction by soxhlet, UB: extraction by ultrasound bath, UH: extraction by ultrasound with horn (130 and 750 W), MAE: microwave-assisted extraction, SFE: supercritical fluid extraction

Table 4Chemical composition of the supercritical fluid extract of *Lippia. sidoides* Cham.

Compound	% Composition	KI experimental	KI Literature
Oxygenated monoterpenes	Thymol	36.01	1280
	Carvacrol	30.88	1292
	Thymol acetate	1.66	1346
Sesquiterpene hydrocarbons	Z Caryophyllene	9.37	1394
	E Caryophyllene	1.59	1420
	Alpha- Humulene	0.91	1438
	Khusimene	0.57	1447
	E-9-Epi-Caryophyllene	0.88	1468
	Gama Himachalenene	0.37	1484
	Germacrene D	1.09	1490
	Alpha Muurolene	0.31	1499
	Silphiperfolan—6-Alpha-ol	0.31	1504
	Gama Cadinene	0.62	1512
	Delta Cadinene	0.89	1520
	Oxygenated sesquiterpenes	Caryophyllene Oxide	6.26
8(15)Dien-5-Alpha-Ol-Caryophylla		t	1642
Hydrocarbons	N-nonadecane	t	1928
	N-Docosane	t	2175
	N-Tetracosane	t	2363
	N-Heptacosane Total identified	0.19	2698
	2,6,10,14,18,22,tetracosahexaene	0.22	2835
	N-Nonacosane	0.37	2898.5
	N-hentriacontane	0.45	3095
Total identified	92.95		

KI: Kovats Index on DB-5 capillary column experimental and by Adams (1995), t: trace.

4 DISCUSSÃO

As ervas medicinais tiveram sua utilização medicinal propagada através dos tempos devido ao coquetel de fitocompostos contidos nas mesmas e que frequentemente atuam de maneira sinérgica no tratamento de doenças, desde que as preparações fitofarmacêuticas tenham sua qualidade assegurada. A padronização de fitomedicamentos tornou-se necessidade diante do potencial de benefícios oriundos do uso de plantas medicinais.

O problema envolvendo a padronização de fitoterápicos encontra raízes na falta de eficácia, falta de metodologias confiáveis para a extração e falta de técnicas analíticas para estabelecer um padrão terapêutico. O procedimento extrativo é o passo básico na pesquisa em extratos brutos, é o ponto inicial no isolamento e purificação dos constituintes químicos presentes nas plantas (HUIE, 2002).

Na década de 80, a antiga CEME (Central de Medicamentos) promoveu o “Encontro sobre plantas medicinais”. Nesta reunião, que contou com a participação de dirigentes da Empresa de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA), do então, Instituto Brasileiro de desenvolvimento Florestal (IBDF, posteriormente incorporado ao IBAMA), Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico (BNDES), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) entre outras, foram constatados problemas na produção de fitoterápicos, que neste período da história estavam em vias de serem oferecidos à população pelos órgãos públicos. A fim de sanar os problemas e melhorar o quadro de distribuição de medicamentos, principalmente à população de baixa renda, foram tomadas medidas reguladoras, entre elas, foram elencadas 21 plantas, baseadas em informações populares e com critérios médicos, antropológico-sociais, botânico-agronômicos e econômicos. Neste elenco encontrava-se a espécie *L. sidoides*. A CEME não logrou colocar no mercado nacional um fitoterápico totalmente brasileiro, principalmente pela descontinuidade do apoio governamental a partir de 1990 e por sua extinção em 1997 (SANT’ANA, ASSAD, 2004).

A partir de 2006, com a elaboração da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, a Sub-Comissão de Plantas Medicinais e Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira considerou *L. sidoides* uma das espécies de

interesse para a implementação da fitoterapia no SUS (Sistema Único de Saúde). Assim, devido ao novo interesse do poder público, há no país hoje o incentivo à pesquisa e desenvolvimento de medicamentos fitoterapicos envolvendo plantas há muito usadas popularmente.

Uma vez que a maioria dos artigos científicos aborda o uso do óleo essencial de *L. sidoides* como matéria-prima para preparações farmacêuticas com atividade antimicrobiana e também, por sua tintura ser uma forma farmacêutica muito utilizada na preparação de fitoterapicos (MATOS, 1994), foi objeto deste trabalho a obtenção de extratos obtidos por diferentes técnicas extrativas a partir das partes aéreas desta espécie. A larga utilização de tinturas foi um dos motivos para a escolha do o etanol como solvente extrator, pois além de ser usado na preparação das mesmas, apresenta alta constante dielétrica (LETELLIER, BUDZINSKI, 1999) e possibilita uma boa extração por microondas, além de possuir baixa toxicidade.

Em relação ao consumo de etanol na preparação dos extartos, a maceração foi indubitavelmente o extrato que mais consumiu solvente e, por este motivo, houve também um maior consumo de tempo na etapa necessária à filtração e à concentração do extrato. Na seqüência, a extração por Soxhlet também exigiu grande volume de solvente, seguida pelos métodos de ultrassom e microondas. O extrato obtido por extração com fluído supercrítico consumiu 180 ml de CO₂ em 90 minutos. Contudo, apresentou maior economia de tempo, pois foram desnecessárias as etapas de filtração e evaporação, uma vez que, ao ser despressurizado na saída do coletor, o CO₂ volta ao estado gasoso e o extrato é recolhido sem solvente algum. No caso da extração por microondas, além das etapas de filtração, soma-se o tempo gasto com o resfriamento dos viais (20-30 minutos), após a extração propriamente dita. Portanto, no último caso, o consumo de tempo foi maior.

O extrato com maior rendimento foi o obtido por Soxhlet (26,3%), seguido do extrato obtido por microondas (15,9%). Comparando-se os rendimentos obtidos através dos diferentes métodos, pode ser observado que a extração por microondas foi um dos métodos mais rentáveis e mais rápidos, mas está entre os mais morosos. Além disso, a extração por microondas e soxhlet foram, no geral, as que apresentaram as piores concentrações inibitórias mínimas (CIMs), que variaram entre 1,25-5,00 mg/ml, principalmente frente aos isolados clínicos que, teoricamente, são mais resistentes. WILGA, KOT-WASIK, NAMIESNIK 2007, também estudaram

as vantagens e desvantagens de diferentes métodos extrativos na extração de robenidina em alimento para aves. Os resultados mostraram que a extração por microondas gera mais resíduos que os métodos de extração por ultrassom e os métodos convencionais de extração, havendo a necessidade de filtração ou centrifugação. O mesmo foi constatado em nosso experimento, havendo a necessidade de filtração após a extração e resfriamento do vial.

No geral, os extratos etanólicos secos obtidos pelos diferentes métodos foram similares quanto aos seus caracteres organolépticos, apresentando coloração esverdeada e odor aromático, com exceção dos obtidos por microondas. Os últimos apresentaram coloração mais escura, o que pode ter sido ocasionado pela lixiviação de impurezas, como já foi previamente reportado por MANDAL, MOHAN, HEMALATHA, 2007. Segundo estes autores, o fato ocorre devido à rápida ruptura da parede celular submetida a temperaturas elevadas. A ocorrência de impurezas em maior quantidade pode ser constatada durante o processo de filtração, que apresentou relativa dificuldade, pois o extrato apresentava-se com finas partículas de pequeno diâmetro que depositavam no fundo do recipiente, diferentemente dos extratos obtidos por ultrassom, maceração e soxhlet.

Uma vez que o extrato obtido por microondas apresentou valores maiores de CIM, a extração de grandes quantidades de impurezas pode ter ocasionado a diluição das substâncias ativas. Outro fato a ser considerado, são as altas temperaturas atingidas durante o processo de extração, que podem levar à degradação de constituintes termolábeis ou à evaporação de componentes voláteis.

Nossos resultados não mostraram superioridade na atividade antimicrobiana dos extratos obtidos por ultrassom. *S. aureus*, uma bactéria Gram-positiva, produtora de toxinas, foi a única exceção em relação ao valor de CIM apresentado para o extrato obtido por este método. Frente ao microrganismo acima citado, a CIM apresentada pelo extrato obtido pela sonda de 130 W foi semelhante ao do apresentado pelo extrato obtido por CO₂ supercrítico (0,63 mg/ml). Entretanto, para todas as outras bactérias, as CIMs foram menores quando incubadas com o extrato obtido por CO₂ supercrítico. Através da comparação dos valores de CIM correspondentes aos diferentes extratos obtidos por ultrassom (sondas de 130 e 750W, bem como banho ultrassônico), pode ser constatado que não houve superioridade em relação aos demais métodos.

Quanto ao rendimento, a sonda de 750 W apresentou o melhor resultado (11,2%), seguida do banho de ultrassom (10,1%) e, finalmente, da sonda de 130 W (7,1%). Na extração de saponinas do ginseng, para a qual foi utilizada extração por banho e por sonda, sem renovação de solvente, a extração por sonda não demonstrou apresentar vantagens evidentes em relação à extração por banho. Adicionalmente, segundo os autores, a extração por sonda apresenta uma desvantagem, já que viabiliza apenas uma extração por vez (WU, LIN., CHAU, 2001). Essa também foi observada em nossos experimentos, pois a extração por banho permitiu a extração concomitante de três diferentes amostras de material vegetal. Contudo, os rendimentos pouco expressivos poderiam ter sido maiores, caso o solvente tivesse sido renovado durante o processo, causando, neste caso, uma maior difusão dos constituintes para o solvente, mesmo aumentando o gasto de solvente e tempo, necessário ao processo de filtração. Na extração por sonda, esperavam-se melhores rendimentos pois este método é tido como superior ao banho devido a intensidade da cavitação ser maior e ser aplicada diretamente sobre a amostra, o que, teoricamente, aumentaria o rendimento (CAPELO, MADURO, VILENA, 2005).

O extrato obtido por fluído supercrítico apresentou aspecto próprio e diferente dos demais, de consistência pastosa, odor aromático e coloração amarelada com rendimento de 1,37%, menor consumo de tempo e um dos menores consumos de solvente, quando comparado aos outros métodos. Além disso, demonstrou atividade antimicrobiana superior e valores iguais de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima para cepas padrão de *B. cereus* (0,31 mg/ml), *P. aeruginosa* (2,5 mg/ml) e *S. aureus* (0,62 mg/ml). A atividade bactericida foi maior do que as concentrações testadas apenas contra o isolado clínico de *B. cereus*, que, no entanto, apresentou concentração inibitória de 0,16 mg/ml. Concluímos que este isolado clínico em especial, apresenta diminuição de crescimento frente ao extrato obtido por fluído supercrítico, mas devido à sua resistência, não foi eliminado pelos agentes antimicrobianos do extrato, sendo menos suscetível que *P. aeruginosa* ATCC, cuja CBM foi 2,5 mg/ml.

Outros autores pesquisaram a atividade de óleos essenciais e compostos isolados frente a cepas de *P. aeruginosa* e *B. cereus*. Nos estudos com *B. cereus* confirmaram a interação do carvacrol com a membrana celular, dissolvendo a

bicamada de fosfolipídios e se alinhando entre as cadeias de ácidos graxos (ULTEE, KETS, SMID, 1999). Esta distorção na estrutura física causa expansão e desestabilização da membrana, aumentando sua fluidez e tornando-a mais permeável (ULTEE, BENNIK, MOEZELAAR, 2002). A passagem de metabólitos através da membrana celular foi investigada e demonstrou-se que a taxa de diminuição de ATP intracelular não foi proporcional ao aumento extracelular, sugerindo que a síntese de ATP foi reduzida ou que a taxa de hidrólise do ATP foi aumentada, devido a presença de carvacrol. Medidas do potencial de membrana durante a fase de crescimento exponencial da bactéria revelaram um enfraquecimento da força motriz de prótons. O gradiente de pH através da membrana celular enfraqueceu em presença de carvacrol e foi completamente dissipado nas concentrações iguais ou maiores que 1 mM. Desta forma, o carvacrol forma canais através da membrana por desagregar pedaços da cadeia de ácidos graxos dos fosfolipídios, permitindo que os íons saiam do citoplasma (ULTEE, KETS, SMID, 1999). Além da inibição de crescimento de células bacterianas vegetativas de *B. cereus*, a inibição da produção de toxinas causadoras de diarreia também foi observada para o carvacrol (ULTEE, SMID, 2001). A avaliação dos mecanismos bacterianos de resistência ao carvacrol também foi avaliada. Os lipídios das membranas são moléculas adaptáveis às perturbações do meio, por súbitas mudanças na composição da cadeia acila ou grupos funcionais e podem alterar estruturalmente a bicamada de lipídios. O caráter lipofílico dos compostos obtidos dos óleos essenciais favorece as interações com a membrana. De fato, a hidrofobicidade facilita a partição dos constituintes dos óleos nos lipídeos da membrana bacteriana, causando distúrbios e aumentando a permeabilidade. Como o carvacrol afeta a célula bacteriana através de várias formas não foi evidenciado um mecanismo de resistência em particular. Entretanto, *B. cereus* mostrou-se resistente quando avaliado frente a doses sub-letais em um pré-tratamento com carvacrol, diminuindo a fluidez da membrana por modificações na composição e fluidez dos ácidos graxos (DIPASQUA et al., 2006, BAKKALI et al., 2008)

Em ensaios utilizando *E. coli* O157:H7, *Pseudomonas fluorescens*, e cepas de *Salmonella typhimurium*, que cresceram em presença de timol e carvacrol, ambos em altas concentrações, foi demonstrada uma maior resistência a estes compostos. Entretanto, ao avaliar as mudanças na composição da membrana lipídica, as

concentrações dos ácidos graxos insaturados foi sempre maior que a de ácidos graxos saturados. Estudos indicam que as membranas compostas de ácidos graxos saturados tendem a ser relativamente mais rígidas que aquelas compostas por ácidos graxos insaturados. Um aumento no comprimento da cadeia de ácidos graxos é outro fator importante para a célula sobreviver, principalmente em ambientes ácidos. Este mesmo mecanismo de adaptação ocorre quando a célula cresce na presença de timol e carvacrol. Os resultados mostraram que *E. coli* O157:H7 continha, sob condições controle, ácidos graxos de cadeia média ou curta (C4-C14) e de cadeia longa (C20-C22); no entanto, quando as células cresceram em meios suplementados com timol e carvacrol houve aumento de cadeias C20-C22. Segundo DIPASQUA *et al.*, 2006, o efeito final de fluidez da membrana é um somatório dos efeitos de cada lipídio individualmente. Contudo, as alterações ambientais afetam a membrana no que diz respeito à composição de seus ácidos graxos.

Vários efeitos do timol foram examinados em bactérias da cavidade oral. Sua atividade contra *Porphyromonas gingivalis*, *Selenomonas artemidis* e *Streptococcus sobrinus*, demonstrou que o efluxo extremamente rápido dos constituintes intracelulares provocados pelo timol é consequência de seus efeitos membranotrópicos. Existe correlação entre perda de conteúdo intracelular induzido por timol com a concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima, sugerindo que o modo de ação seja a perfuração da membrana. O declínio de ATP intracelular provocado pelo timol em *S. sobrinus* pode ser atribuído ao vazamento de conteúdo intracelular, enquanto em *P. gingivalis* parece ter havido inibição na rota formadora de ATP (HUMMELBRUNNER, ISMAN, 1995).

Na análise cromatográfica, do extrato obtido por fluido supercrítico de *L. sidoides*, foi detectada uma grande proporção de constituintes monoterpênicos oxigenados e sesquiterpenóides. Os monoterpênicos majoritários foram timol e carvacrol. Estudos de STASHENKO, JARAMILLO, MARTINEZ, 2004 avaliaram o extrato de *Lippia alba*, espécie relacionada ao gênero *Lippia*, obtido por fluido supercrítico em comparação com outras técnicas utilizadas na extração do óleo essencial. A técnica de extração por fluido supercrítico permitiu analisar mais eficientemente os compostos menos voláteis, como os sesquiterpenóides. Os autores observaram que este extrato continha quantidades maiores de

sesquiterpenóides e de hidrocarbonetos de alto peso molecular, com cadeias de mais de 25 átomos de carbono em relação à hidrodestilação e à hidrodestilação acoplada ao microondas. (STASHENKO, JARAMILLO, MARTINEZ, 2004). Estas classes de substâncias também puderam ser detectadas no extrato obtido por fluido supercrítico de *L. sidoides* obtido nas condições descritas neste trabalho (50°C e 150 bar).

Com relação aos constituintes majoritários de *L. sidoides*, timol e carvacrol (figura 14), detectados na análise cromatográfica, ambos monoterpênóides com estrutura fenólica, constituídos de duas unidades de isopreno, cada uma com cinco átomos de carbono (C5). Sua biossíntese inicia com o precursor chamado difosfato de isopentenila (IPP). Repetidas adições de unidades de IPP formam os precursores prenildifosfatados, sendo que, no caso dos monoterpênóides, origina-se o difosfato de geranila. Através da modificação do difosfato de geranila, pela ação das enzimas sintetases, forma-se o esqueleto terpênico e finalmente originam-se as reações enzimáticas subseqüentes e/ou através de reação redox no esqueleto terpênico, originam-se os monoterpênóides. Estes, portanto, são formados pelo acoplamento de 2 unidades isopreno, logo, apresentam 10 átomos de carbono (BAKKALI, *et al.* 2008).

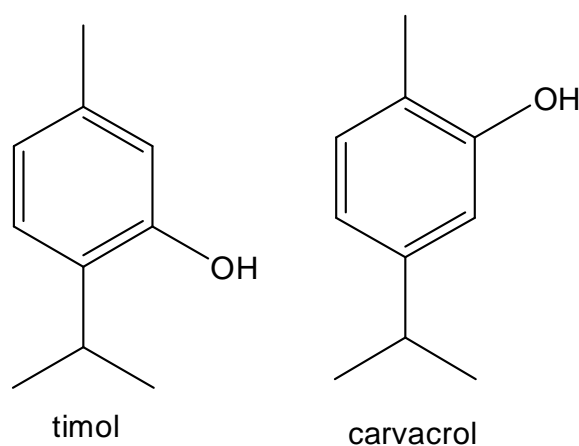


Figura 14 - Fórmulas estruturais dos constituintes majoritários do óleo essencial de *L. sidoides* Cham.

Os monoterpênóides timol e carvacrol têm um grupamento hidroxila em localização diferente no anel benzênico e são, portanto, isômeros de posição.

Timol apresenta a fórmula $C_{10}H_{14}O$ e massa molecular 150.2, cujo sinônimo é 5-metil-2-(metiletil)fenol. Em estado puro é constituído por cristais pouco solúveis em água, muito solúveis em álcool, óleos essenciais e óleos em geral. É moderadamente solúvel em glicerol, dissolve-se em soluções básicas diluídas. Timol é usado corriqueiramente na indústria farmacêutica e alimentícia como conservante e antisséptico (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2005). Seu isômero carvacrol é o 5-isopropil-2-metilfenol, de fórmula e massa moleculares idênticas ao timol. É um constituinte do óleo essencial de várias plantas aromáticas como a *Satureja hortensis* L., *S. montana*, *Origanum dictamnus*, *O. majorana*, *Thymus vulgaris*, *T. capitatus*, *T. serpyllum*, *T. zygis*, entre outras. É usado como flavorizante, em alimentos, podendo ser adicionado na ordem de 2 ppm em bebidas e 25 ppm em doces (VICENCENZI, *et al.*, 2004).

Quanto aos aspectos toxicológicos, o timol é 4 vezes menos tóxico que o organofosforado monocrotofos, 21 vezes menos tóxico que o organofosforado endosulfan, 55 vezes menos tóxico que o carbamato metomil e 875 vezes menos tóxico que o piretróide cipermetrina (ARMES, *et al.*, 1997.).

Em pesquisa para avaliação de atividade contra *Aedes aegypti*, o óleo essencial de *L. sidooides* e seu hidrolato apresentaram atividade larvicida, sendo o timol o constituinte responsável pela atividade. Os autores verificaram que o hidrolato foi mais potente que o organofosforado temefos (CARVALHO *et al.* 2003; CAVALCANTI *et al.* 2004; COSTA *et al.* 2005).

Timol e carvacrol apresentaram $LD_{50\%}$ menor que 100 μg para a larva de *Spodoptera litura*, uma praga do cultivo do tabaco (HUMMELBRUNNER, ISMAN, 2001).

Segundo STAMMATI *et al.*, 1999, timol e carvacrol tiveram fraca atividade mutagênica no teste de Ames, sendo que através deste teste é avaliada a ocorrência de mutação da histidina na bactéria *Salmonella typhimurium* (STAMMATI *et al.*, 1999).

AYDIN, BASARAN, BASARAN, 2005, não observaram atividade citotóxica em baixas concentrações de timol e carvacrol, sendo que as duas substâncias preveniram a quebra da cadeia de DNA induzida artificialmente em linfócitos; entretanto, provocaram quebra da fita de DNA em altas concentrações.

O carvacrol não apresentou toxicidade em ensaios para avaliação de toxicidade sub-aguda, toxicidade crônica, carcinogenicidade e teratogenicidade. Em dose única de 1,5 mM/Kg a administração de uma mistura de carvacrol e timol 93:7, por gavagem, ocasionou um ligeiro aumento hepático de bifenil-4-hidrolase (DE VINCENZI *et al.*, 2004). O carvacrol é excretado na forma de conjugados glicuronídeos e sulfatos ou inalterado, quando administrado na dose de 1 mM/kg v.o., sofre oxidação nos grupamentos metila, podendo resultar em derivados do álcool benzílico e do 2-fenilpropanol e seus respectivos ácidos carboxílicos. A hidroxilação do anel resulta em metabólitos minoritários.

O carvacrol permanece levemente adsorvido no intestino de coelhos. Após 22 horas da administração de 1,5 g, quase 30% da dose ainda é detectada no trato gastrointestinal, sendo que 25% é excretada pela urina (DE VINCENZI *et al.*, 2004).

Estudos têm avaliado a atividade antimicrobiana de timol e carvacrol, que demonstraram um amplo espectro de atividade antimicrobiana, tanto contra bactérias Gram-positivas quanto para as Gram-negativas, além de atividade fungicida (MANUSCRITO 1; BURT, 2004; CHAMI *et al.*, 2005; TAMPIERI *et al.*, 2005; ULTEE *et al.*, 2001).

Carvacrol, timol e trans-cinamaldeído inibiram o crescimento de *E. coli* e *S. typhimurium* por desintegrarem a parte externa da membrana celular e liberarem material intracelular. Timol e carvacrol diminuíram o ATP extracelular, comprovando assim a injúria da membrana citoplasmática (HELANDER, 1998).

Isolados clínicos de MRSA foram testados frente à carvacrol e timol, sendo suscetíveis a ambos. Os melhores valores de CIM apresentados foram para o carvacrol, em torno de 0.015-0.03%, v/v, enquanto que para o timol as CIMs foram de cerca de 0.03-0.06%, v/v (NOSTRO *et al.*, 2004).

A principal característica do carvacrol e do timol é o seu grupamento hidroxila e a deslocalização de elétrons no anel benzeno. O grupamento hidroxila é fundamental para a atividade antimicrobiana tanto que um grupo metoxila afeta a hidrofobicidade da molécula e altera seu tamanho, interferindo na interação específica com a célula bacteriana. Além disso, a posição relativa da hidroxila influencia a atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, quando se compara as atividades do timol e do carvacrol (DORMAN, DEANS, 2000; VELDHUIZEN *et al.*, 2006).

Derivados do carvacrol tiveram sua atividade antibacteriana avaliada contra cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Por remoção dos substituintes do anel observou-se que a atividade antimicrobiana se reduz. O mesmo ocorre com a remoção de um dos grupos laterais do carvacrol, que resultou em maiores valores de CIM. Além disso, a remoção do substituinte hidroxila, originando o *p*-cimeno, resultou em uma completa perda de atividade. Esta perda de atividade foi revertida pela substituição das hidroxilas por um grupamento amino, originando o 2-amino-*p*-cimeno. No caso de substituição de um grupo metila dando origem ao 3,4-dimetilcumeno, não foi observada completa inibição de crescimento bacteriano nas concentrações testadas. A remoção dos grupos alifáticos das cadeias laterais do carvacrol, gerando o 3-isopropilfenol e *o*-cresol, resultou em baixa atividade, provavelmente devido à diminuição nas características anfipáticas nessas moléculas (VELDHUIZEN, *et al.*, 2006). Assim, concluíram que a anfipaticidade do carvacrol pode ser uma condição necessária para conferir a melhor orientação na membrana celular: a parte hidrofílica da molécula interage com a parte polar da membrana, enquanto que o anel benzeno, hidrofóbico, e as cadeias laterais alifáticas, se encaixam nas partes internas da membrana bacteriana.

Em trabalho que investigou a relação estrutura-atividade do carvacrol, em comparação com eugenol, mentol, éter metílico do carvacrol e acetato de carvacrila contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e cepas de fungos, observou-se que o eugenol e mentol exibiram fraca atividade antimicrobiana quando comparados ao carvacrol, sendo este o mais hidrofóbico de todos. O éter metílico do carvacrol e o acetato de carvacrila não foram eficientes, deixando clara a importância da hidroxila livre para a atividade antimicrobiana.

Compostos lipofílicos possuem uma alta afinidade por membranas celulares e suas inserções podem induzir alterações nas propriedades físico-químicas das mesmas. Essas alterações afetam tanto a ordenação dos lipídeos quanto a estabilidade da bicamada de lipídeos, resultando no aumento de permeabilidade com fluxo passivo de prótons e desestabilização da membrana. Tanto o grupo hidroxila quanto um sistema de deslocalização de elétrons são importantes para a atividade antimicrobiana de compostos fenólicos como carvacrol e o timol. Tal estrutura particular permite a estes compostos agirem como trocadores de prótons, o que reduz o gradiente através da membrana citoplasmática. O resultado do colapso

da força motriz dos prótons e a depleção do ATP levam a morte celular. A importância da deslocalização de elétrons no sistema, permitindo a hidroxila liberar seu próton, foi observada no efeito do carvacrol em relação ao mentol. Contudo, no sistema de deslocalização de elétrons do acetato de carvacrila e do éter metílico do carvacrol é possível que estes se transformem em aceptores de elétrons, uma vez que não são capazes de liberar um próton através do grupo éster ou éter. A habilidade da ligação com o hidrogênio e sua liberação induz a alterações conformacionais na da membrana bacteriana, resultando em morte celular (ARFA *et al.*, 2006, CRISTANI *et al.*, 2007).

Em hambúrgueres contaminados com *E. coli* O157:H7, o carvacrol facilitou a inativação térmica da bactéria e reduziu a formação de aminas heterocíclicas carcinogênicas, formadas devido a altas temperaturas no cozimento (FRIEDMAN *et al.*, 2009).

Em trabalhos avaliando o timol e sua ação contra *S. typhimurium* e *S. aureus*, foi observado que este composto liga-se à proteínas de membrana por pontes de hidrogênio, causando alterações de permeabilidade da mesma. O timol foi mais eficiente em pH 5.5 e 6.5. e, em pHs menores, a molécula de timol deve estar dissociada e por isso é mais hidrofóbica, ligando-se melhor as áreas de proteínas mais lipofílicas (BURT 2004).

A propriedade de compostos fenólicos causarem distúrbios na membrana é explorada para extração de lipopolissacarídeos de bactérias. HELANDER *et al.*, 1985, comprovaram que o timol e o carvacrol ganharam acesso ao periplasma e partes mais profundas da célula. LAMBERT *et al.*, 2001 estudaram células bacterianas de *P. aeruginosa* e *S. aureus* e demonstraram, através de sondas de brometo de etídio, que os compostos timol e carvacrol podem penetrar além da membrana citoplasmática. Não houve penetração significativa de brometo de etídio no controle, mas quando adicionado o carvacrol ou o timol (0-1%), a fluorescência aumentou em 90%±7. Isto indica que o timol e carvacrol lesam a membrana celular e expõem os ácidos nucleicos ao brometo de etídio. Neste estudo *P. aeruginosa* mostrou ser menos sensível que *S. aureus* frente ao timol e ao carvacrol (385 à 450 mg/l), demonstrando que não há antagonismo entre os compostos. Através de cálculos os autores concluíram que, para *P. aeruginosa*, 96% do efeito

antimicrobiano é devido à ação aditiva de timol e carvacrol e 4% foram atribuídos a outros componentes do óleo de orégano.

Pela análise por CG do extrato com maior atividade antimicrobiana, ou seja, aquele obtido por CO₂ supercrítico, foram identificados 92% dos componentes do extrato, sendo que 36,01% foi constituído de timol e 30,88% de carvacrol. SOUZA *et al*, 2002, obteve 6,9% de carvacrol trabalhando a pressão e temperaturas menores do que as descritas neste trabalho.

A presença de carvacrol em alta concentração no extrato de *L. sidoides* pode explicar a ação contra *P. aeruginosa*, uma bactéria que nem sempre é inibida pelo óleo essencial de *L. sidoides*, mas que é suscetível ao carvacrol quando na forma isolada. Esta suscetibilidade aparece também nos casos de cepas resistentes, sendo que seu mecanismo de ação envolve a lesão na membrana celular (COX, MARKHAM, 2007).

Bactérias podem ser intrinsecamente resistentes aos antimicrobianos ou podem adquirir a resistência por uma nova mutação ou por aquisição de genes de outros microorganismos. Uma vez adquirido, os genes para resistência não são facilmente perdidos, ao contrário, tornam-se uma parte relativamente estável do genoma. Determinantes adicionais de resistência podem ser somados aos já vigentes, ampliando o fenótipo de multirresistência. Genes de resistência adquirida podem permitir que uma bactéria inative o produto antibacteriano, modifique o alvo de ação, produza uma via metabólica alternativa que ultrapassa uma etapa da via metabólica comumente utilizada, ou permita que a bactéria expresse mecanismos de efluxo que impedem o antibiótico de atingir o seu alvo intracelular (WOODFORD, ELLINGTON, 2007). Mecanismos de efluxo, sejam específicos ou multifármaco, são determinantes importantes de resistência intrínseca ou adquirida aos antimicrobianos de uso convencional. O conceito de resistência à multifármacos descreve a situação onde a resistência a um antibiótico significa a resistência a outro, sem serem quimicamente relacionados. Este fato está associado à impermeabilidade das camadas exteriores da célula bacteriana, limitando a absorção dos antimicrobianos (RUSSEL, 2001), Isto é o que acontece com bactérias Gram negativas, que são menos suscetíveis que as Gram-positivas, uma vez que suas paredes celulares apresentam uma barreira maior. A camada externa das Gram negativas age como uma barreira permeável, com estreitos canais de porinas

limitando a penetração de moléculas hidrofílicas e diminuindo a fluidez do folheto de lipopolissacarídeos, e assim, diminuindo a penetração de moléculas lipofílicas (CLOETE, 2003). O modo de ação de fitoquímicos depende de sua estrutura e das propriedades físico-químicas. Óleos essenciais e seus constituintes, como os terpenóides carvacrol e timol, estão envolvidos na ruptura da membrana devido a suas características. Promovem a expansão da membrana, o aumento da sua fluidez e permeabilidade, distúrbios nas proteínas da membrana, inibição da respiração e alteração dos processos de transportes de íons, tanto em Gram-positivas quanto em Gram-negativas (COX *et al*, 2000; SIMÕES, BENNETT, ROSA, 2009).

Em nossos experimentos, constatamos a presença de óxido de cariofileno (6,26%), de *Z*-cariofileno (937%) e de *E*-cariofileno (1,59%) no extrato de *L. sidoides* obtido por fluido supercrítico. O óxido de cariofileno é um sesquiterpenóide oxigenado derivado do *E*-cariofileno por processos de oxidação, seja por autooxidação ou fotooxidação. O *E*-cariofileno apresenta importante papel na química dos sesquiterpenóides. Este composto está relacionado biogeneticamente ao humuleno, com o qual co-ocorre. Na análise cromatográfica de *L. sidoides*, também foi encontrado o humuleno na concentração de 0,91%.

A estrutura incomum do cariofileno, que envolve um anel ciclobuteno fundido em trans num anel de 5 membros contendo um 1,5-dieno, provê a base para uma variedade de transformações que resultam nos sesquiterpenóides tricíclicos (COLLADO, HANSON, MACÍAS-SÁNCHEZ, 1998).

Em estudo avaliando a degradação do *E*-cariofileno, (SKÖLD *et al.*, 2006) os autores comprovaram que terpenos com dupla ligação são suscetíveis à oxidação em presença de ar. Foram investigadas as diferentes concentrações de cariofileno no decorrer do tempo, sendo que a concentração de *E*-cariofileno apresentava redução de 50% após 5 semanas e, após 48 semanas, permanecia apenas 1%. SOUSA *et al*, 2002, ao extrair as folhas de *L. sidoides* em condições subcríticas encontrou óxido de cariofileno o que permite supor que este processo extrativo facilite a oxidação.

"L'homme peut acquérir des connaissances et de devenir un animal,
comme il le veut. Dieu fait des animaux, l'homme fait lui-même. "

Georg Lichetnbery

9 CONCLUSÕES

- Dos 5 métodos extrativos avaliados, a extração por percolação à quente foi a que apresentou os melhores rendimentos.
- O extrato obtido por fluido supercrítico apresentou o menor rendimento.
- O extrato obtido por fluido supercrítico apresentou a melhor atividade antibacteriana, tanto contra Gram-positivas como quanto contra Gram-negativas.
- Tanto as cepas tipificadas quanto os isolados clínicos mostraram maior suscetibilidade frente ao extrato obtido por fluido supercrítico.
- O uso de sondas ultrassônicas não apresentou vantagem em relação ao rendimento do extrato seco obtido por esta técnica, em comparação com o extrato obtido por banho ultrassônico.
- Em relação ao consumo de tempo, a extração realizada por maceração foi a mais demorada, seguida da extração por soxhlet, banho ultrassônico e sondas. A extração por microondas foi mais rápida, entretanto, consumiu tempo para o arrefecimento dos viais, separação das impurezas por filtração e concentração dos extratos.
- A extração por fluido supercrítico dispensou a etapa de filtração e concentração e, portanto, foi a mais rápida e prática.

- Quanto ao consumo de solvente, este foi maior na extração por maceração, seguida da extração por soxhlet, banho ultrassônico, sondas ultrassônicas, extração por fluido supercrítico e microondas.
- O extrato obtido por fluido supercrítico apresentou timol e carvacrol como constituintes majoritários. Outros componentes importantes deste extrato foram acetato de timol, *Z*-cariofileno, *E*-cariofileno, germacreno D e óxido de cariofileno.
- Como marcadores químicos e biológicos para o extrato obtido por fluido supercrítico, foram determinados o timol e o carvacrol.
- Como marcador químico para tinturas foi confirmado o timol.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, U.P. et al. Medicinal Plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **J. Ethnopharmacology**, n. 144, p.325-354, 2007.

ARFA, A.B., et al. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n.2, p. 149-154, 2006.

ARMES, N.J. et al. Status of Insecticide Resistance in *Spodoptera litura* in Andhra Pradesh, India. **Pest. Management Science**, v. 50, n. 3, p. 240–248, 1997.

AYDIN, S.; BASARAN, A.A.; BASARAN, N. The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. **Mutat. Res.**, v. 581, n. 1-2, p. 43–53, 2005.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **B Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BODEKER, G.; KRONENBERG, F. A Public Health Agenda for Traditional, Complementary, and Alternative Medicine. **American Journal of Public Health**, v. 92, n.10, p. 1582-1591, 2002.

BRASIL. **Portaria Interministerial** Nº 2.960, de 9 de dezembro de 2008. Disponível em:<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri2960_09_12_2008.html>. Acesso em 20/07/2009.

BRASIL. **Atos dos poder executivo**. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e dá outras providências.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: Her Majesty's Stationery Office, 2005.

BRUNNER, G. In: Gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation process. Darmstadt, Alemanha: Steinkopff, v.4, 1994.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **J Food Engineering**, v. 67, n. 1-2, p. 21-33, 2004.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, 2004.

CALIXTO, J.B. In.: Biodiversidade como fonte de medicamentos. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252003000300022&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 05/05/ 2009.

CAMEL, V. Recent extraction techniques for solid-matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. **The analyst**, v. 126, p. 1182-1193, 2001. DOI: 10.1039/b008243k.

CAPELO, J.L.; MADURO, C.; VILHENA, C. Discussion of parameters associated with the ultrasonic solid–liquid extraction for elemental analysis (total content) by electrothermal atomic absorption spectrometry. An overview. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 12, n. 3, p. 225–232, 2005.

CARVALHO, A.F.U. et al. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n.4, p. 569-571, 2003.

CAVALCANTI, E.S.B. et al. Larvicidal activity of essential oils from brazilian plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n.5, p.541-544, 2004.

CHAMI, N. et al. Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol in vitro and in vivo. **Oral Microbiology Immunology**, v. 20, n.2, p. 106–111, 2005.

CHEMAT, S. et al. Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 19, n. 3, p. 188-195, 2004.

CLOETE, T.E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 277-282, 2003.

COLLADO, I.G.; HANSON, J.R.; MACÍAS-SÁNCHEZ, A.J. Recent advances in the chemistry of caryophyllene. **Natural Products Reports.**, v. 15, n. ,p. 187 - 204, 1998.

COSTA, J.G.M. et al. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas de *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.

COX, S.D.; MARKHAM, J.L. Susceptibility and intrinsic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to selected plant volatile compounds.. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 4, p. 930-936, 2007.

COX, S.D. et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 170-175, 2000.

CRAVEIRO, A.A. ; MATOS, F.J.A. ; ALENCAR, J.W. Microwave oven extraction of an oil essential. **Flavour and Fragrance**, v. 4, n. 1, p. 43-44, 1989.

CRISTANI, M.T. et al. Interaction of Four Monoterpenes Contained in Essential Oils with Model Membranes: Implications for Their Antibacterial Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 15, p. 6300-6308, 2007.

DELATTRE, L. Applications pharmaceutiques du dioxyde de carbone supercritique. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 65, n. 1, p. 58-67, 2007.

DEL VALLE, J.M.; AGUILERA, J.M. Revision: Extracción con CO₂ a alta presión. Fundamentos y aplicaciones en la industria de alimentos. **Food Science and Technology International**, v. 5; n. 1, p. 1-24, 1999.

DEL VALLE, J.M.; DE LA FUENTE, J. C.; CARDARELLI, D.A. Contributions to supercritical extraction of vegetable substrates in Latin América. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n.1-2, p. 35-57, 2005.

DI PASQUA, R. et al. Changes in Membrane Fatty Acids Composition of Microbial Cells Induced by Addition of Thymol, Carvacrol, Limonene, Cinnamaldehyde, and Eugenol in the Growing Media **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2745-2749, 2006.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, D.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308–316, 2000.

ESKILSSON, C.S.; BJÖRKLUND, E. Analytical-scale microwave-assisted extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 902, n. 1, p. 227-250, 2000.

FONTENELLE, R.O.S., et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n.5, p.934-940, 2007. TESE

FRIEDMAN, M. et al. Carvacrol Facilitates Heat-Induced Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and Inhibits Formation of Heterocyclic Amines in Grilled Ground Beef Patties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 5, p. 1848–1853, 2009.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal Plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n1, 2006.

HEIZMANN, B.M. **Subcomissão de Plantas Medicinais e Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. 2006. Comunicado pessoal.

HELANDER, I.M. et al. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. **Journal of Agric. Food Chem.**, v. 46, n. 9, p. 3590–3595, 1998.

HUMMELBRUNNER, L.A.; ISMAN, M.B. Acute, Sublethal, Antifeedant, and Synergistic Effects of Monoterpenoid Essential Oil Compounds on the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n.2 p. 715-720, 2001.

HUMMELBRUNNER, L.A.; ISMAN, M.B. The action of thymol on oral bacteria. **Oral Microbiol Immunol**. v. 10, n. 4, p. 241-246, 1995.

HUIE, C.W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 373, n. 1-2, p. 23-30, 2002.

KAUFMANN, B.; CHRISTEN, P. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n.2, p. 105-113, 2002.

KONGSTON, H.M.; JASSIE L.B. In: Introduction to microwaves sample preparation, theory and practice, American chemical society: Washington D.C., U.S.A., 1988.

LAMBERT, R.J.W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

LANG, Q.; WAI C.M. Supercritical extraction in herbal and natural product studies – a practical review. **Talanta**, v.53, n. 4, p. 771-782, 2001

LETELLIER, M.; BUDZINSKI, H. Microwave assisted extraction of organic compounds. **Analisis**, v.27, n. 3, p. 259-271, 1999.

LUQUE-GARCIA, J.L.; CASTRO, L.M.D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41-47, 2003.

MANDAL, V.; MOHAN, Y.; HEMALATHA, S. Review Article Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, n. 1, p. 7-18, 2007.

MARTINES, M.A.U.; DAVOLOS, M.R.; JAFELICCI JÚNIOR, M. O efeito do ultra-som em reações químicas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 251-255, 2000.

MATOS, F.J.A. In: Em **Farmácias Vivas. Sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**, 2º ed., Fortaleza: Editora Universidade do Ceará, 1994.

MATOS, F.J.A.; OLIVEIRA, F.. *Lippia sidoides* Cham., - pharmacognosy, chemistry and pharmacology. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 79, n. 3/4, p. 84-87, 1998.

NEAS, E.D.; COLLINS M.J. **Introduction to microwaves sample preparation, theory and practice**. American Chemical Society: Washington D.C., U.S.A., 1988, CHAP.2, 7-32.

NOSTRO, A. et al. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **Microbiology Letters**, v. 230, n. 2, p. 191-195, 2004.

NUNES, R.S. et al. Padronização Botânica de Lippia sidoides Cham. (Verbenaceae). **Acta Boanaerense**, v. 19, n. 2, p. 115-118, 2000.

PAWLISZYM, J.J. Kinetic model of supercritical fluid extraction. **Chromatography Science**, v. 31, n. 1, p.31-37, 1993.

PINTO, A.C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 25, s. 1, p.45-61, 2002.

POURMORTAZAVI, S.M.; HAJIMIRSADEGHI, S.S. Supercritical fluids extraction on plant essential and volatile oil analysis. **Journal of Chromatography A**, c.1163, n. 1-2, p. 2-24, 2007.

RAVENTOS, M.; DUARTE, S.; ALARCON, R. Application and Possibilities of Supercritical CO₂ Extraction in Food Processing Industry: An Overview. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 5, p.269-284, 2002.

REID R.C.; PRAUSNITZ J.M.; POLING, B.E. The properties of gases and liquids. USA: 4th Ed. McGraw-Hill Book Company; 1987, 741p.

REVERCHON, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 10, n. 1, p. 1-37, 1997.

RODRIGUES, V. M. et al. Determination of the solubility of extracts from vegetable raw material in pressurized CO₂: a pseudo-ternary mixture formed by cellulosic structure+solute+solvent. **J. Supercritical fluids**, v. 22, n. 1, p. 21-36, 2002.

ROMDHANE M.; GOURDON, C.; CADAMATTA G. Local investigation of some ultrasonic devices by means of a thermal sensor. **ULTRASONICS**, v. 33, n.3, p. 221-227, 1995.

RUSSEL, A.D. Mechanisms of bacterial insusceptibility to biocides . **American Journal of Infection Control**, v. 29, n. 4, p. 259-261, 2001.

SANT'ANA, P.J.P., ASSAD, A.L. D. Programa de pesquisa em produtos naturais: a experiência da CEME. **Química Nova**, v. 27, n.3, p.508-512, 2004.

SIMÕES, M.; BENNETT, R.N.; ROSA, E.A.S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Nat. Prod. Rep.**, v. 26, n. 6, p. 746-757, 2009.

SKÖLD, M. et al. The fragrance chemical β -caryophyllene—air oxidation and skin sensitization. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 4, p. 538-545, 2006.

SOUSA, E.M.B.D. et al. Experimental results for the extraction of essential oil from *Lippia sidoides* Cham, using pressurized carbon dioxide. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 2, p. 229-241, 2002.

STASHENKO, E.E.; JARAMILLO, B.E.; MARTINEZ, J.R. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, n. 1, p. 93–103, 2004.

STAMMATI, A. et al. A. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. **Food and Chemical Toxicology** v. 37, n. 8, p. 813–823, 1999.

STICHER, O. Natural product isolation.. **Natural Product Reports**, v. 25, n. 3, p. 517–554, 2008.

SUSLICK, K. et al. Acoustic cavitation and its chemical consequences. **Philosophical Transactions of Royal Society of London A**, v. 357, n. 1751, p. 335-353, 1999.

SUSLICK, K. In.: The Chemical Effects of Ultrasound. Disponível em: www.scs.uiuc.edu/suslick/ Acessado em 19/04/2007.

TAMPIERI, M.P. et al. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. **Mycopathologia**, v. 159, n. 3, p. 339-345, 2005.

TOMA, M. et al. Investigation of the effects on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 2, p.137-142, 2001.

ULTEE, A.; KETS, E.P.W.; SMID, E.J. Mechanisms of Action of Carvacrol on the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4606–4610, 1999.

ULTEE, A.; SMID, E.J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 373-378, 2001.

ULTEE, A.; BENNIK, M.H.J.; MOEZELAAR, R. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 68, n.4, p. 1561–1568, 2002.

VELDHUIZEN, E.J.A., TJEERDSMA-VAN BOKHOVEN, J.L.M., ZWEIJTZER, C., BURT, S.A., HAAGSMAN, H.P. Structural Requirements for the Antimicrobial Activity of Carvacrol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, n. 5, p. 1874-1879, 2006.

VILKHU, K.; MAWSON, R.; SIMONS, L.; BATES, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n, 2, p. 161–169, 2008.

VINAROTU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonis Sonochemistry**, v.8, n. 3, p. 303-313, 2001

VINCENZI, M.; STAMMATI, A.; VINCENZI, A.; SILANO, M. Safety data review. Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75, n.7-8, 801– 804, 2004.

VOIT, R. In.: Pharmazeutische Technologie.7 Ausgabe, Berlin:Ullstein Mosby,1993

WAGNER, H. In.:**Pharmazeutische Biologie**, 5° Aufl. Vol. 2: Drogen und ihre Inhaltsstoffe. Stuttgart: Gustav Fischer, 1993. 522p.

WANG, L.; WELLER, C.L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 6, p. 300–312, 2006.

WILGA, J.; KOT-WASIK, A.; NAMIESNIK, J. Comparison of extraction techniques of robenidine from poultry feed samples. **Talanta**, v. 73, n.5, p. 812-819, 2007.

WOODFORD, N.; ELLINGTON, M.J. The emergence of antibiotic resistance by mutation. **Clinical Microbiology & Infection**, v. 13, n. 1, p. 5-18, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. In.: Traditional medicine. Disponível em: <http://www.who.int/topics/traditional_medicine/en/>. Acesso em 11/05/2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. In.: International Conference on Primary Health Care, Alma-Ata, USSR, 6-12 September 1978 Disponível em: <http://www.who.int/hpr/NPH/docs/declaration_almaata.pdf>. Acesso em 17/07/2009.

WU, J.; LIN, L.; CHAU, F. Ultrasoun-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. **Ultrasound Sonochemistry**, v. 8, n. 4, p. 347-352, 2001.