



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DE *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae)

RAFAELA DAMASCENO SÁ

RECIFE

2013

RAFAELA DAMASCENO SÁ

ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DE *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Karina Perrelli Randau

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

RECIFE

2013

Catálogo na Publicação
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- S111e Sá, Rafaela Damasceno.
Estudo farmacognóstico de *Chenopodium ambrosioides* L.
(Chenopodiaceae) / Rafaela Damasceno Sá. – Recife: O autor,
2013.
104 f.: il.; tab.; 30 cm.
- Orientadora: Karina Perrelli Randau.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, 2013.
Inclui bibliografia e anexos.
1. *Chenopodium ambrosioides*. 2. Cromatografia gasosa. 3.
Controle de qualidade. 4. Estudos de validação. I. Randau, Karina
Perrelli (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2013-089)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



Recife, 22 de fevereiro de 2013.

Defesa de Dissertação de Mestrado de **Rafaela Damasceno Sá** defendido e **APROVADO**, por decisão unânime, em 22 de fevereiro de 2013 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRA EXAMINADORA INTERNA: Prof.^a Dr.^a Karina Perrelli Randau
(Depto. de Ciências Farmacêuticas - UFPE)

Assinatura: _____

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Severino Granjeiro Júnior
(Depto. de Farmácia - FPS)

Assinatura: _____

SEGUNDA EXAMINADORA EXTERNA: Prof.^a Dr.^a Flávia Carolina Lins da Silva
(Centro de Educação e Saúde - UFCG)

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^a. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Antônio Rodolfo de Faria

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dalci José Brondani

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof^a. Nereide Stela Santos Magalhães

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof^a. Ana Cristina Lima Leite

Dedico este trabalho aos meus pais, Luís
Vieira de Sá e Francisca Rodrigues
Damasceno Sá.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, por me conceder saúde, força e determinação para superar todos os obstáculos que apareceram ao longo da realização deste trabalho.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Karina Perrelli Randau, pela excelente condução da pesquisa, pelo apoio, pela confiança em mim depositada e pelos ensinamentos transmitidos.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares, pela acolhida no laboratório e pela colaboração com o desenvolvimento do trabalho.

À Universidade Federal de Pernambuco, por meio do Departamento de Ciências Farmacêuticas e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos ensinamentos que contribuíram para minha formação.

À empresa Pernambuco Participações e Investimentos S/A, através do farmacêutico Fontinele e do jardineiro Fábio, pelo fornecimento do material vegetal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Severino Grangeiro Junior e Prof^a. Dra. Flávia Carolina Lins da Silva, pela valiosa contribuição.

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia, pelos bons momentos de convivência e pelas experiências compartilhadas. Agradeço especialmente à Asaph Santana, Marcos Galvão e Magda Ferreira, que sempre que precisei se mostraram prontamente disponíveis para ajudar.

Aos meus grandes amigos do Piauí, que, mesmo distantes, se fazem presentes, me apoiando, incentivando e compartilhando os bons e maus momentos, em especial: Nathália Rocha, Layelle Araújo, Anajara Ferraz, Giovana Damasceno, Jardeliny Penha, Lanessa Sá, Dayse Martins, Alana Rodrigues, Franklin Almeida, Renata Eufrásio e Lívia Moura.

Aos amigos que fiz em Recife desde 2006, em especial Rayanne Melo, Amanda Casé, Thaís Teixeira, Helen Mazetto, Saulo Dias e José Walter, que me ajudaram a suportar a saudade e a distância da minha cidade natal. Sei que posso contar com vocês a qualquer hora. E à Hyalyne Santos, pela amizade e pela boa convivência diária.

Aos meus queridos amigos do curso de Farmácia da UFPE, que desde o primeiro dia de aula me acolheram tão bem, por todo o incentivo nesta caminhada e pelos momentos de alegria que só vocês me proporcionam. Amizade que quero levar para toda a vida, principalmente: Anne Cecília, Ingrid Araújo, Luciana Arrais, Luma Gomes, Renato Lino,

Diego Menelau, Flávia Grandelle, Karla Santana, Salvana Costa, Márcia Barbosa, Alan Lucena, Evanilson Alves, Marconi Coelho e Laércio Brandão.

Ao meu ex-namorado e amigo Leandro Macedo (*in memorian*). Perder você em 2012 foi meu momento de maior dor, a vontade era de desistir de tudo, porque a vida parecia não ter mais sentido. Foi difícil superar os dias de saudade, porque quando ela se tornava insuportável, aumentava ainda mais. Dias em que eu só queria dormir, porque era o único momento em que eu não lembrava disso. Mas eu tinha que concluir esse trabalho, então, também foi meu momento de maior superação e de engrandecimento da minha fé. Obrigada por ter feito parte da minha vida. Nunca te esquecerei.

À minha família, que confia, acredita e torce por mim. Obrigada pela união, força, carinho e amizade essenciais para que eu perseverasse diante das dificuldades encontradas.

Ao meu irmão, Jarbas Damasceno Sá, por ser o irmão mais chato e ao mesmo tempo o melhor irmão do mundo.

Finalmente agradeço aos meus pais, Luís Vieira de Sá e Francisca Rodrigues Damasceno Sá, que são meus exemplos, meus melhores amigos, minha proteção, meu porto seguro, que nunca pouparam esforços para me proporcionar uma boa educação e uma vida melhor. Obrigada por sofrerem junto ou até mais do que eu e por acreditar que eu conseguiria.

"Todos nós seguimos nossa própria jornada. Cada um de nós vive sua própria aventura, encontra todo tipo de desafios, e as escolhas que fazemos no caminho é que irão nos definir. Essas escolhas vão nos pressionar e nos testar e nos levar ao nosso limite. E a nossa aventura nos fará tão fortes como jamais pensamos que poderíamos ser."

Joseph Campbell

RESUMO

Chenopodium ambrosioides L., conhecida popularmente como mastruz, é uma erva amplamente distribuída no Brasil e muito utilizada como anti-helmíntica e para tratamentos de gripe. Como os estudos farmacológicos demonstram suas propriedades terapêuticas e devido ao amplo e reconhecido uso popular, a espécie possui grande potencial para se tornar um fitoterápico. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi realizar um estudo farmacognóstico da espécie. Foram realizados cortes transversais para análise microscópica de raiz, caule e pecíolo; nas folhas foram feitos cortes transversais, paradérmicos e testes histoquímicos. Através de cromatografia em camada delgada, investigou-se a presença de metabólitos secundários nas folhas, nas quais também foi determinado o teor de flavonoides totais utilizando espectrofotometria. Foi extraído ainda das folhas o óleo essencial, através de hidrodestilação, e calculado o rendimento. Para estabelecer o perfil quali-quantitativo e determinar a composição do óleo essencial, utilizou-se cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Foram avaliados todos os parâmetros exigidos pela ANVISA para a validação de método desenvolvido para quantificação dos constituintes do óleo essencial por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama. Os principais caracteres úteis na identificação da planta resultantes da análise microscópica foram: presença de idioblastos contendo areia cristalina no mesofilo, na nervura principal e no parênquima de caule e pecíolo; presença de tricomas tectores e glandulares capitados na folha e no caule; e crescimento secundário na raiz e no caule formado por uma sucessão de arcos cambiais. Através dos testes histoquímicos, ficou demonstrado que os cristais são de oxalato de cálcio, assim como se evidenciou a presença de substâncias lipídicas, esteroides, óleos essenciais e oleoresinas. Com relação à prospecção fitoquímica, foi demonstrada a presença de açúcares redutores, monoterpenos e sesquiterpenos, triterpenos e esteroides e flavonoides glicosilados. O teor de flavonoides totais calculado foi de $1,61 \pm 0,02$ (1,51%). A extração do óleo essencial das folhas teve um rendimento médio de $0,7\% \pm 0,0982$. Considerando a análise CG-EM do óleo essencial, pode-se constatar a presença de 10 picos, com tempos de retenção entre 18,7 e 55,2 minutos. Os constituintes majoritários encontrados foram α -terpineno (42,14%) e α -terpinenil-acetato (31,57%). O conteúdo de ascaridol, geralmente relatado como majoritário, foi de 0,87%. Um teor elevado de ascaridol já foi relatado no Brasil e também em outros países, o que leva a conclusão de que o local de coleta da planta é um importante fator a ser considerado para a análise do óleo essencial de *C. ambrosioides*. O método proposto para a quantificação dos constituintes do óleo essencial mostrou-se linear, com alta sensibilidade de quantificação, além de ser considerado específico, preciso, exato e robusto. Os resultados obtidos fornecem informações relevantes para a identificação e controle de qualidade da espécie, já que a planta não apresenta monografia nos códigos atuais.

Palavras-chave: α -terpineno, *Chenopodium ambrosioides* L., cromatografia gasosa, mastruz, óleo essencial.

ABSTRACT

Chenopodium ambrosioides L. (Chenopodiaceae), commonly known as mastruz, is an herb widely distributed in Brazil and mostly used as anthelmintic and treatments for influenza. Due to pharmacological studies demonstrating its therapeutic properties and wide recognized and popular use, this species has great potential to become a phytomedicine. In this context, the work aimed to conduct a pharmacognostic study of the species. Were performed cross sections for microscopic analysis of root, stem and petiole; in the leaves were made transverse sections, paradermal and histochemical tests. Through thin layer chromatography, it was investigated the presence of secondary metabolites in leaves, which was also determined the content of total flavonoids using spectrophotometry. The essential oil was extracted from the leaves by hydrodistillation, and the yield was calculated. To establish the profile and determine qualitative and quantitative composition of the essential oil, was used gas chromatography coupled to mass spectrometry. Were evaluated all the parameters required by ANVISA for the validation method developed for quantification of constituents of the essential oil by gas chromatography with flame ionization detector. The main characters useful in the identification of the plant resulting microscopic analysis were: presence of idioblasts containing crystalline sand in the mesophyll, midrib and in the parenchyma of stems and petioles; presence of tector trichomes and capitate glandular trichomes in leaves and stem, and secondary growth in the root and stem formed by a succession of arcs of cambium. Through the histochemical tests, it was shown that the crystals are calcium oxalate, as well as revealed the presence of lipid substances, steroids, essential oils and oleoresins. With respect to the phytochemical screening, was demonstrated the presence of reducing sugars, monoterpenes and sesquiterpenes, triterpenes and steroids and glycosides flavonoids. The content of total flavonoids calculated was 1.61 ± 0.02 (1.51%). The extraction of essential oil from the leaves had an average yield of $0.7\% \pm 0.0982$. Considering the GC-MS analysis of essential oil, it can be verified the presence of 10 peaks with retention times between 18.7 and 55.2 minutes. The major constituents found were α -terpinene (42.14%) and α -terpinenil-acetate (31.57%). The contents of ascaridol, usually reported as the majority, was 0.87%. A high content of ascaridol has been reported in Brazil and other countries, which leads to the conclusion that the collection site of the plant is an important factor to be considered for the analysis of essential oil of *C. ambrosioides*. The proposed method for the quantification of constituents of the essential oil was linear with high sensitivity quantitation, besides being specific, precise, accurate and robust. The results provide information relevant to the identification and quality control of the species, since the plant does not present monograph in current codes.

Keywords: α -terpinene, *Chenopodium ambrosioides* L., essential oil, gas chromatography, mastruz.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. <i>Chenopodium ambrosioides</i> L., Chenopodiaceae.....	47
Figura 2. <i>Chenopodium ambrosioides</i> L., Chenopodiaceae – secção transversal da raiz	48
Figura 3. <i>Chenopodium ambrosioides</i> L., Chenopodiaceae – secção transversal do caule	49
Figura 4. <i>Chenopodium ambrosioides</i> L., Chenopodiaceae – secção transversal do caule	50
Figura 5. <i>Chenopodium ambrosioides</i> L., Chenopodiaceae – secção transversal do pecíolo ..	51
Figura 6. <i>Chenopodium ambrosioides</i> L., Chenopodiaceae – vista frontal da lâmina foliar ...	52
Figura 7. <i>Chenopodium ambrosioides</i> L., Chenopodiaceae – secção transversal da lâmina foliar	53
Figura 8. <i>Chenopodium ambrosioides</i> L., Chenopodiaceae – histoquímica	54
Figura 9. <i>Chenopodium ambrosioides</i> L., Chenopodiaceae – reagente de Nadi.....	55
Figura 1 – Espectro de varredura do extrato de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	63
Figura 1. CG-EM do óleo essencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	73
Figura 1. Cromatograma do padrão de timol.....	83
Figura 2. Cromatograma do óleo essencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	83
Figura 3. Curva de calibração construída com padrão de timol (40-200 µg/mL)	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Nomes populares de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	22
Tabela 2 – Principais compostos encontrados no óleo essencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	28
Tabela 1 – Sistemas cromatográficos utilizados para a caracterização química do extrato de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	61
Tabela 1. Composição química do óleo essencial das folhas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> .	72
Tabela 1. Análise de variância obtida a partir dos resultados da precisão intermediária	85
Tabela 2. Resultados obtidos no teste de recuperação.....	85
Tabela 3. Análise de variância obtida a partir dos resultados da robustez	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CG-DIC	Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DPR	Desvio Padrão Relativo
IC ₅₀	Concentração de inibição a 50%
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
KI	Índice de retenção de Kováts
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
PERPART	Pernambuco Participações e Investimentos S/A
RE	Resolução Específica
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
SUS	Sistema Único de Saúde
TFT	Teor de Flavonoides Totais
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

m	metro
L	litro
g	grama
mL	mililitro
%	porcentagem
µg	micrograma
µL	microlitro
mg	miligrama
ppm	partes por milhão
h	hora
cm ²	centímetro quadrado
>	maior que
cm	centímetro
µm	micrômetro
v/v	volume/volume
s	segundo
min	minuto
m/v	massa/volume
nm	nanômetro
p/p	peso/peso
mm	milímetro
±	mais ou menos
°C	grau Celsius
eV	elétron-volt
R ²	coeficiente de determinação
=	igual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 CAPÍTULO I	21
3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1.1 Óleo essencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.: estado da arte	22
4 CAPÍTULO II	42
4.1 ANÁLISE MORFOANATÔMICA DE <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. (Chenopodiaceae)	43
4.1.1 Artigo 1 – Análise Morfoanatômica de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. (Chenopodiaceae)	43
4.2 METABÓLITOS SEUNDÁRIOS DE <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. (Chenopodiaceae)	60
4.2.1 Prospeção fitoquímica e quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. (Chenopodiaceae)	60
5 CAPÍTULO III	69
5.1 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. POR CG-EM	69
5.1.1 Artigo 2 – Composição química do óleo essencial das folhas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. cultivadas em Recife-PE, Brasil	70
6 CAPÍTULO IV	77
6.1 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA O ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	77
6.1.1 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a quantificação dos constituintes do óleo essencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama	78
7 CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS	91
ANEXO	93
ANEXO A - Orientações para a publicação de artigos na Revista Brasileira de Farmacognosia	94
ANEXO B - Orientações para a publicação de artigos no Flavour and Fragrance Journal	99
ANEXO C - Orientações para a publicação de artigos na Química Nova	102

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas no tratamento de doenças vem sendo realizado pelo homem há milhares de anos. Na luta pela sobrevivência, o homem encontrou nas plantas uma fonte de alimento e, ao mesmo tempo, deparou-se com suas propriedades tóxicas ou curativas (ALVES, 2001). Os primeiros relatos de uso dos recursos da flora com finalidade terapêutica remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers (PINTO et al., 2002). Desde então, as observações e experimentações dos povos primitivos sobre as propriedades terapêuticas de diversas plantas vem sendo propagadas de geração em geração, fazendo parte da cultura popular (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

No século XVIII, foram isoladas as primeiras substâncias puras do reino vegetal (PINTO et al., 2002). Durante muitos anos os fármacos de origem sintética dominaram o mercado farmacêutico (LIMA et al., 2006). Porém, a partir dos anos 1980, a diversidade vegetal do globo voltou a ser o centro da atenção, ressurgindo o interesse pela pesquisa de substâncias de origem vegetal como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos. Isso se deu graças aos avanços técnicos e ao desenvolvimento de novos métodos de isolamento dessas substâncias (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Soma-se a isso o fato de que, nas últimas décadas, ocorreu uma importante mudança no paradigma das sociedades ocidentais, fazendo com que os produtos de plantas passassem novamente a ocupar papel de destaque, com número crescente de adeptos nas populações de países em desenvolvimento e mesmo nos países mais industrializados (MONTANARI; BOLZANI, 2001). Tem-se vivido recentemente um modismo naturalista, no qual o uso das drogas fitoterápicas tem crescido notadamente, apesar dos avanços dos fármacos sintéticos (CALIXTO, 2000).

Observa-se também um certo investimento em pesquisas que trazem à luz o conhecimento popular e secular das plantas medicinais para uso humano e animal, evitando, dessa forma, que sejam esquecidas plantas cujos usos merecem divulgação e reconhecimento, inclusive porque são de fácil uso caseiro (LIMA et al., 2006).

No Brasil, existem iniciativas do governo para valorização do conhecimento popular e da utilização de produtos naturais pela população em seus cuidados primários de saúde. O Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos é um importante exemplo. As ações decorrentes do mesmo serão imprescindíveis para, dentre outros aspectos, promover o uso sustentável da biodiversidade brasileira e da valorização e preservação do conhecimento tradicional associado das comunidades tradicionais e indígenas (BRASIL, 2009a).

A importância das plantas medicinais é um fato. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), no início da década de 1990 cerca de 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de conseguir os cuidados básicos de saúde, pois há dificuldade no acesso aos centros de atendimentos hospitalares, aos exames e aos medicamentos clássicos. O custo mais elevado dos medicamentos sintéticos também influencia significativamente a escolha dos produtos naturais. Assim, a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais contribuem para sua utilização pelas populações carentes (VEIGA Jr; PINTO; MACIEL, 2005). No Nordeste do Brasil, as plantas medicinais são comumente usadas na preparação de remédios caseiros para tratar várias enfermidades. São comercializadas livremente em feiras, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL et al., 2002). Além do fácil preparo das formulações caseiras, muitas vezes as plantas suprem a falta de medicamentos nos serviços de saúde (SANTOS et al., 2011).

Diante da biodiversidade do Brasil, o Ministério da Saúde (MS) tem investido no uso da fitoterapia como prática complementar no Sistema Único de Saúde (SUS). Assim, o desenvolvimento do setor de plantas medicinais e fitoterápicos pode se configurar como importante estratégia para enfrentar as desigualdades regionais existentes em nosso país. Além disso, ampliar as opções terapêuticas ofertadas aos usuários do SUS, garantindo o acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia, é uma importante estratégia com vistas à melhoria da atenção à saúde da população e à inclusão social (BRASIL, 2006).

Uma das ações do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos era elaborar a Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos a serem disponibilizados no SUS. Isso se concretizou em 2009, quando o Governo Federal Brasileiro divulgou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). A RENISUS tem o objetivo de incentivar e direcionar pesquisas científicas para plantas que possuam potencial para se tornarem fitomedicamentos (BRASIL, 2009b).

Dentre as 71 espécies vegetais presentes na RENISUS, encontra-se *Chenopodium ambrosioides* L., conhecida popularmente no Brasil como mastruz (ALBUQUERQUE et al., 2009). A erva ocorre em quase todo o território brasileiro (SOUSA et al., 2004; LIMA et al., 2006) e é muito utilizada como anti-helmíntica e para tratamentos de gripe (MORAIS et al., 2005; ALMEIDA et al., 2009). Têm sido relatadas várias atividades biológicas para *C. ambrosioides*, tais como antitumoral (NASCIMENTO et al., 2006), antipirética e analgésica

(HALLALA et al., 2010), antifúngica (JARDIM, 2006), anti-helmíntica (GUIMARAES; LLANOS; ACEVEDO, 2001) e leishmanicida (MONZOTE et al., 2007).

A planta está descrita na Farmacopeia Brasileira 1ª edição, onde sua monografia descreve o óleo essencial obtido por arraste a vapor (PHARMACOPOEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL, 1926). Contudo, atualmente, a planta não apresenta monografia nos códigos oficiais, nem se observa na literatura estudos na direção de estabelecer parâmetros de qualidade para a espécie.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo farmacognóstico de *Chenopodium ambrosioides* L., com o intuito de fornecer maiores subsídios para o controle de qualidade da espécie.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever microscopicamente a raiz, caule, pecíolo e folha de *C. ambrosioides*;
- Realizar testes histoquímicos nas folhas de *C. ambrosioides*;
- Investigar a presença de metabólitos secundários nas folhas de *C. ambrosioides*;
- Determinar o teor de flavonoides totais nas folhas de *C. ambrosioides* através de espectrofotometria no ultravioleta-visível;
- Extrair o óleo essencial das folhas de *C. ambrosioides* e calcular seu rendimento;
- Estabelecer o perfil quali-quantitativo do óleo essencial de *C. ambrosioides* e determinar sua composição através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.
- Desenvolver e validar um método analítico para quantificação dos compostos do óleo essencial de *C. ambrosioides* por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama.

3 Capítulo I

3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1.1 Óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L.: estado da arte

INTRODUÇÃO

Chenopodium ambrosioides L. é uma planta herbácea do gênero *Chenopodium*, pertencente à família Chenopodiaceae, que é composta por mais de 100 gêneros de larga distribuição em todo o mundo (JOLY, 2002). *C. ambrosioides* é nativa da América Central e do Sul, originária, provavelmente, do México. Tem crescimento espontâneo em regiões de clima tropical, subtropical (principalmente América e África) e temperado (desde o Mediterrâneo até a Europa Central) (KISMANN, 1991). No Brasil é extensa a sua distribuição, com ocorrência em quase todo o território. A espécie é uma erva perene ou anual, que atinge até 1 m de altura, em média, sendo bastante ramificada. As folhas são alongadas, alternas, pecioladas, de tamanhos diversos, onde as menores ficam localizadas na parte superior da planta. As flores são pequenas, verdes, dispostas em espigas axilares densas. Produz numerosas sementes esféricas, pretas e ricas em óleo. Tem cheiro forte, desagradável e característico (SOUSA et al., 2004; LIMA et al., 2006). A planta tem sido utilizada na culinária tradicional e na medicina popular. Suas folhas são usadas, frequentemente, como condimento e na preparação de bebidas e bolos (PICÓ; NUEZ, 2000).

Nos vários países onde se encontra, *C. ambrosioides* recebe diferentes denominações populares, relacionados na Tabela 1.

Tabela 1 – Nomes populares de *Chenopodium ambrosioides* L.

Nome popular	Referências
<i>Brasil</i> mastruz, mastruço (Norte, Nordeste); mentruz, erva-de-Santa-Maria (Sudeste).	ALBUQUERQUE, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2009; ALENCAR et al., 2010; ALMEIDA et al., 2009; ALMEIDA et al., 2010; CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010; GARCIA; DOMINGUES; RODRIGUES, 2010; LIMA et al., 2006; MEDEIROS; FONSECA; ANDREATA, 2004; MONTEIRO et al., 2011; MORAIS et al., 2005; PINTO; AMOROZO; FURLAN, 2006; RAMOS; SOLEDADE; BAPTISTA, 2011; SOUSA et al., 2004.

Outros países da América

caré (Bolívia); paico (Colômbia, México; Peru); hierba santa, hierba de Santa María, hierba hedionda, paico macho, paico oloroso, pichín, té de los jesuitas (Colômbia); davioxon e huesaxa lqo (Argentina); sime kontwá (Dominica); Mexican tea, American wormseed, goosefoot, epazote (México). ALONSO-CASTRO et al., 2012; BLANCKAERT et al., 2012; HAJDU; HOHMANN, 2012; JARAMILLO; DUARTE; DELGADO, 2012; KLIKS, 1985; LUZIATELLI et al., 2010; MARTÍNEZ; BARBOZA, 2010; QUINLAN; QUINLAN; NOLAN, 2002; REHECHO et al., 2011.

África

kanunka uncono. RIBEIRO et al., 2010.

Europa

te sicilianu (Itália); té, té borde, té burrero, té de Argentina, té de España, té de Europa, té de Méjico, té de Montserrat, té de Nueva España, te español, té falso, té hormigoso, té hormiguero, té rico, té silvestre, te verde (Espanha). SANTAYANA; BLANCO; MORALES, 2005.

Ásia

wormseed, Mexican tea, epazote (China). CHU; HU; LIU, 2011.

Chenopodium ambrosioides surge espontaneamente, mas também é, por vezes, cultivada em jardins, quintais ou áreas agrícolas (BLANCKAERT et al., 2012). Pode ser plantada através de sementes (LIMA et al., 2006). No México, os jardineiros ocasionalmente agitam as plantas para estimular a queda das sementes, em seguida fazem a poda, para permitir uma rápida germinação (BLANCKAERT et al., 2012). A espécie prefere solos de textura média, com boa fertilidade e suprimento moderado de água, tolerando solos salinos. O desenvolvimento vegetativo é favorecido por boa iluminação e as plantas se tornam mais competitivas em regiões e em épocas de dias longos, sendo o florescimento estimulado por dias curtos (CORREA, 1984; KISMANN, 1991).

Usos etnomedicinais de *Chenopodium ambrosioides*

O uso medicinal de *C. ambrosioides* é relatado pela primeira vez na literatura européia no século XVIII, quando o botânico sueco Peter Kalm reporta o uso da planta pelos nativos e pelos europeus nas colônias americanas para o tratamento do verme intestinal *Ascaris* sp.

Talvez essa seja a planta mais conhecida pelos indígenas americanos com propriedade anti-helmíntica (KLIKS, 1985).

Atualmente, a espécie ainda continua sendo muito usada para o tratamento de doenças parasitárias em todo o mundo, por exemplo, em países da América, como no Brasil (PINTO; AMOROZO; FURLAN, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2009; ALMEIDA et al., 2009; ALENCAR et al., 2010; ALMEIDA et al., 2010), Bolívia (HAJDU; HOHMANN, 2012), Peru (LUZIATELLI et al., 2010; REHECHO et al., 2011), Argentina (MARTÍNEZ; BARBOZA, 2010), Colômbia (JARAMILLO; DUARTE; DELGADO, 2012), Dominica (QUINLAN; QUINLAN; NOLAN, 2002), México (ALONSO-CASTRO et al., 2012; BLANCKAERT et al., 2012) e Cuba (VOLPATO et al., 2009); em países da África, como na Nigéria (GBOLADE; TIRA-PICOS; NOGUERIA, 2010) e Camarões (NOUMI; YOMI, 2001); e também na Itália (NAPOLI, 2008), China (CHU; HU; LIU, 2011) e Índia (PRASAD et al., 2009).

Dada à ampla distribuição de *Chenopodium ambrosioides* por muitas regiões do planeta, a Organização Mundial de Saúde (OMS) a considera como uma das plantas medicinais mais utilizadas em todo o mundo (LORENZI; MATOS, 2002).

Para o tratamento dos parasitas intestinais, a população de Camarões utiliza a preparação de dois punhados das folhas de *C. ambrosioides* infundidos em 1,5 L de água. A administração indicada é de um copo cheio para os adultos e meio copo para as crianças, duas vezes por dia, durante dois dias (NOUMI; YOMI, 2001). Os imigrantes haitianos que vivem em Cuba citam duas posologias: uma para episódios agudos e outra para infecções crônicas. No primeiro caso, o remédio deve ser tomado todo dia antes do café durante três ou sete dias. No segundo caso, deve-se tomar apenas durante a lua nova, sendo o remédio ingerido periodicamente ao longo do ano (VOLPATO et al., 2009). No México, a dose tomada varia de 10 a 50 g de planta por litro de água, ingerindo de um a três copos (KLIKS, 1985). No Brasil, utiliza-se 20 folhas verdes machucadas misturadas com 100 mL de leite, mel de abelhas ou suco de laranja. A preparação deve ser bebida em um só dia e o procedimento repetido após dez dias (LIMA et al., 2006).

Além do destacado uso no tratamento de vermes, a planta também é tradicionalmente usada no tratamento de doenças de etiologias diversas. Na Espanha, o té de España, ou chá da Espanha, de *C. ambrosioides*, é utilizado para distúrbios digestivos (SANTAYANA; BLANCO; MORALES, 2005). A infusão das folhas também é utilizada no México para dores de estômago (ALONSO-CASTRO et al., 2012), no Peru para cólicas (LUZIATELLI et al., 2010) e na África para úlceras intestinais (RIBEIRO et al., 2010).

No Brasil, emprega-se a decocção das partes aéreas para aliviar dores musculares; para tratar lesões nos ossos usa-se o emplastro (GARCIA; DOMINGUES; RODRIGUES, 2010). No Nordeste do país, onde a espécie é largamente usada, as folhas são batidas no liquidificador com leite para tratamentos de gripe (MORAIS et al., 2005). Já na Bolívia, usa-se para gripe um xarope obtido da raiz da planta (HAJDU; HOHMANN, 2012).

Adicionalmente, a espécie também é usada no Brasil como antifúngico (FENNER et al., 2006), para inflamação uterina e inflamações em geral (CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010; RAMOS; SOLEDADE; BAPTISTA, 2011), e como antibiótico e expectorante (SOUZA; FELSELI, 2006). Em regiões endêmicas de leishmaniose, a população frequentemente utiliza suas folhas no tratamento tópico das úlceras provocadas pela doença (FRANÇA; LAGO; MARSDEN, 1996).

Apesar de, geralmente, se usar mais a infusão ou a decocção de *Chenopodium ambrosioides*, quer seja de toda a planta ou de suas partes, também o uso do óleo essencial, obtido principalmente das partes aéreas, é frequente em algumas regiões. O óleo essencial é constituído principalmente de monoterpenos, sendo o ascaridol o componente majoritário em vários estudos. A propriedade anti-helmíntica da planta tem sido atribuída à presença desse monoterpeno (GUPTA et al., 2002). Em 1924, Smillie e Pessoa foram os primeiros a demonstrar que a atividade anti-helmíntica do óleo era devido ao conteúdo de ascaridol.

O extrato alcoólico das sementes e o óleo de *C. ambrosioides* foram oficialmente reconhecidos pela Farmacopeia dos Estados Unidos de 1820 a 1947 (KLIKIS, 1985). O óleo essencial, chamado de essência de quenopódio, também fez parte da primeira edição da Farmacopeia Brasileira em 1926 (PHARMACOPOEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL, 1926).

Desde 1900 que o óleo essencial é utilizado por pacientes para tratar vermes (LEVY, 1914). Só no Brasil, entre os anos 1916 e 1921, mais de um milhão de pessoas receberam tratamento com o óleo de *C. ambrosioides*, administrado pelo Conselho Internacional de Saúde em conjunto com o Governo Brasileiro (SMILLIE; PESSOA, 1924). No entanto, foram registradas ocorrências de alguns acidentes fatais, resultantes da ingestão de altas doses do óleo. Por isso, o desenvolvimento de novos anti-helmínticos mais seguros e eficazes levou ao declínio da sua produção comercial (PAGET, 1926).

Mesmo assim, por causa de sua popularidade profundamente enraizada, algumas comunidades continuam a usar o óleo essencial como forma de tratar as infecções provocadas por helmintos, graças à sua aparente eficácia, baixo custo e fácil disponibilidade (MACDONALD et al., 2004).

Metabólitos secundários de *Chenopodium ambrosioides*

Diferentes classes de metabólitos secundários, que são conhecidos por possuírem potentes atividades biológicas, têm sido relatadas para a planta. Entre eles, fenóis e flavonoides (JORGE; FERRO; KOSCHTSCHAK, 1986; ALENCAR et al., 2010), saponinas (GUPTA; BEHARI, 1972; OKHALE et al., 2012), alcaloides (HASEEB et al., 1978; HEGAZY; FARRAG, 2007; HALLALA et al., 2010; OKHALE et al., 2012), taninos (ALENCAR et al., 2010; HALLALA et al., 2010), carboidratos (HEGAZY; FARRAG, 2007; OKHALE et al., 2012), terpenos e esteroides (HEGAZY; FARRAG, 2007; HALLALA et al., 2010; OKHALE et al., 2012).

Quercetina foi encontrada nas partes aéreas e frutos de *C. ambrosioides* (BAHRMAN, JAY, GORENFLOT, 1985; JAIN et al., 1990). Os frutos contêm vários compostos flavônicos. Jain et al. (1990) descreveram kaempferol e dois novos flavonoides glicosilados de kaempferol, além de isoramnetina. Arisawa et al. (1971) isolaram um glicosídeo de kaempferol das folhas de *C. ambrosioides*, denominado ambroside.

Dentre os terpenos, *C. ambrosioides* é conhecida por conter principalmente monoterpenos, como ascaridol e α -terpineno, encontrados no extrato hexânico bruto das folhas (JARDIM et al., 2010). Paré et al. (1993) também isolaram o ascaridol junto com cis-p-mentadieno-1(7),8ol-2 das partes aéreas da planta. O ascaridol é um composto que apresenta um grupo hidroperóxido em sua estrutura. Não são muitas as espécies vegetais que tem a capacidade de produzir o ascaridol. Além de *C. ambrosioides*, este terpenoide é encontrado no óleo essencial de *Peumus boldus* Molina (VILA; VALENZUELA; BELLO, 1999; DEL VALLE et al., 2004), *Croton regelianus* Muell. Arg. (TORRES et al., 2008; BEZERRA et al., 2009) e no óleo essencial das extremidades floridas de *Artemisia molinieri*, o qual apresenta um teor da ordem de 62,1% (CARNAT; LAMAISSON, 1992).

Kiuchi et al. (2002) isolaram o ascaridol e quatro outros monoterpenos hidroperóxidos das partes aéreas da planta, determinados como sendo (-)-(2S,4S)- e (-)-(2R,4S)-p-menta-1(7),8-dien-2-hidroperóxido e (-)-(1R,4S)- e (-)-(1S,4S)-p-menta-2,8-dien-1-hidroxiperóxido.

O óleo essencial de *C. ambrosioides* também é rico em monoterpenos (BAUER; BRASIL, 1973). Kasalli et al. (2006) isolaram dois raros monoterpenos, 1,2:3,4-di-epoxi-p-mentano e 1,4-epoxi-p-menth-2-eno, do óleo nas folhas.

ÓLEO ESSENCIAL DE *Chenopodium ambrosioides*

Composição química

Os primeiros estudos sobre a composição química do óleo essencial de *C. ambrosioides* datam do início do século XX. Nessa época, o óleo estava sendo bastante utilizado em todo o mundo como anti-helmíntico (LEVY, 1914), despertando o interesse da comunidade científica para provar sua eficácia e descobrir qual seria o composto responsável pela sua atividade. De acordo com Smillie e Pessoa (1924), os autores que estudavam a composição do óleo concordavam que o mesmo consistia em ascaridol, variando de 45 a 70%, e uma mistura de hidrocarbonetos líquidos, que constituía de 25 a 35% do óleo. Na fração de hidrocarbonetos líquidos foram identificados cimeno, α -terpeno, felandreno, limoneno e outras substâncias.

Os relatos sobre diferenças na composição do óleo começam ainda nessa época, quando Henry e Paget (1921, apud SMILLIE; PESSOA, 1924), estudando a composição da fração de hidrocarbonetos líquidos do óleo, encontraram cimeno e α -terpeno, mas não encontraram limoneno e felandreno. Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007), a constância de concentração de metabólitos secundários é praticamente uma exceção. Apesar de existir um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (LINDROTH; HSIA; SCRIBER, 1987; HARTMANN, 1996).

Com o desenvolvimento de novas técnicas analíticas, como a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), foi possível identificar novos compostos presentes no óleo essencial de *C. ambrosioides*.

Percebe-se que sua composição diverge consideravelmente em relação à porcentagem relativa dos compostos em função do local de coleta do material vegetal. O α -terpineno é o componente majoritário no óleo essencial de planta coletada na Nigéria (ONOCHA et al., 1999; KASALI et al., 2006; GBOLADE; TIRA-PICOS; NOGUERIA, 2010), em Rwanda (MUHAYIMANA; CHALCHAT; GARRY, 1998), na Colômbia (JARAMILLO; DUARTE; DELGADO, 2012), em Camarões (CHEKEM et al., 2010) e na Índia (GUPTA et al., 2002; SINGH et al., 2008). Em contrapartida, na Índia também foi encontrado *m*-cimeno como majoritário, correspondendo a 43,90% do óleo (PRASAD et al., 2009). O *p*-cimeno corresponde a 50% da constituição química do óleo essencial de material coletado em Camarões (TAPONDJOU et al., 2002). O ascaridol, principal componente do óleo essencial

coletado no Brasil (JARDIM et al., 2008), em Madagascar (CAVALLI et al., 2004), Togo (KOBAYASHI et al., 2009), no Mediterrâneo Oriental (DEMBITSKY; SHKROB; HANUS, 2008) e na China (CHU; HU; LIU, 2011), é encontrado em uma porcentagem mínima de 0,1%, no óleo essencial de planta da Nigéria (ONOCHA et al., 1999). Os principais compostos encontrados no óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* estão listados na Tabela 2 de acordo com o local de coleta da planta.

Tabela 2 – Principais compostos encontrados no óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L.

Local – Referência	ascaridol	α - terpineno	α - terpinil- acetato	m- cimeno	p- cimeno	limoneno
<i>Brasil</i>						
JARDIM et al., 2008	80%	0,90%	-	-	2,0%	-
<i>Camarões</i>						
TAPONDJOU et al., 2002	3,5%	37,6%	-	-	50,0%	-
CHEKEM et al., 2010	0,7%	51,3%	-	-	23,4%	0,9%
<i>China</i>						
CHU; HU; LIU, 2011	29,7%	1,1%	-	-	12,7%	-
<i>Colômbia</i>						
JARAMILLO; DUARTE; DELGADO, 2012	1,91%	60,29%	-	-	20,49%	1,1%
<i>Cuba</i>						
PINO; MARBOT; REAL, 2003	-	-	73,9%	-	4,3%	-
<i>Índia</i>						
GUPTA et al., 2002	6,2%	63,6%	-	-	19,5%	-
SINGH et al., 2008	19,21%	47,37%	-	-	25,77%	-
PRASAD et al., 2009	-	-	-	43,90%	0,09%	-
<i>Madagascar</i>						
CAVALLI et al., 2004	41,8%	9,7%	-	-	16,2%	3,8%
<i>Mediterrâneo Oriental</i>						
DEMBITSKY; SHKROB; HANUS, 2008	53,4%	6,4%	-	-	3,5%	1,7%

<i>México</i>						
SAGRERO-NIEVES; BARTLEY, 1995	-	-	-	-	-	32,5%
<i>Nigéria</i>						
ONOCHA et al., 1999	0,1%	56,0%	15,7%	-	15,5%	0,6%
KASALI et al., 2006		55,6%	-	-	16,7%	1,1%
GBOLADE; TIRA- PICOS; NOGUERIA, 2010	1,1%	53,4%	-	-	21,1%	1,4%
<i>Rwanda</i>						
MUHAYIMANA; CHALCHAT; GARRY, 1998	7,2%	72,7%	-	-	15,3%	0,8%
<i>Togo</i>						
KOBA et al., 2009	51,12%	6,35%	-	-	19,88%	-

A época em que a planta é coletada também é um fator que altera a composição do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides*. Torres et al. (2006) analisaram a composição do óleo essencial da espécie coletada na Argentina em três épocas do ano: verão, outono e primavera. No verão, o componente majoritário foi α -felandreno (40,0%), o qual é encontrado em traços no outono. Nesta época, são encontrados α -pineno (32,7%) e limoneno (32,5%) em maiores concentrações. Na primavera, essas proporções caem para 17,4% para α -pineno e 27,7% para limoneno. Com relação ao conteúdo de ascaridol, esse se mostrou sem muitas variações durante as três estações, sendo encontrados 8,6% no verão, 9,2% no outono e 9,5% na primavera.

Além da composição, o rendimento do óleo essencial também sofre alteração em função do local em que a planta foi coletada. A extração do óleo essencial de *C. ambrosioides* de Camarões apresentou um rendimento de 0,8% (TAPONDJOU et al., 2002), de planta da Nigéria exibiu rendimento de 0,06% (ONOCHA et al., 1999), de Togo 0,8% (KOBA et al., 2009), de Rwanda 0,3% (MUHAYIMANA; CHALCHAT; GARRY, 1998), de Cuba 1,0% (PINO; MARBOT; REAL, 2003), da Colômbia 0,4% (JARAMILLO; DUARTE; DELGADO, 2012) e no Brasil, 0,3% (JARDIM et al., 2008). Às vezes, dentro do mesmo país podem-se encontrar diferenças no rendimento do óleo, como no México, onde os rendimentos obtidos foram de 0,8-1,0% (JIMÉNEZ-OSORNIO; KUMAMOTO; WASSER, 1996) e 1,2% (SAGRERO-NIEVES; BARTLEY, 1995), e na Índia, com rendimentos de 0,25% (GUPTA et al., 2002) e 0,5% (PRASAD et al., 2009).

Atividades biológicas

Atividade antioxidante

Através do método ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)], Kumar et al. (2007) verificaram que o óleo essencial das folhas de *Chenopodium ambrosioides* é um potente antioxidante. A atividade de remoção dos íons $ABTS^+$ foi reforçada com o aumento da concentração do óleo, apresentando a melhor atividade na concentração de 3000 µg/mL.

Jaramillo, Duarte e Delgado (2012) mediram a capacidade do óleo essencial das folhas e caule de *C. ambrosioides* de capturar o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil). A porcentagem de captura do óleo foi de 85%, enquanto a do ácido ascórbico (substância antioxidante de referência) foi de 96,5%. Os autores comentam que a atividade antioxidante do óleo pode ser atribuída a diversas razões, como a presença de compostos fenólicos e hidrocarbonetos de natureza monoterpênica e sesquiterpênica.

Atividade antifúngica

Correa-Royero et al. (2010) testaram a atividade de 32 óleos essenciais e 29 extratos de plantas medicinais e aromáticas contra *Candida krusei* e *Aspergillus fumigatus*. Dentre os óleos, o de *C. ambrosioides* destacou-se mostrando uma forte atividade contra *C. krusei*, com uma concentração mínima inibitória (CMI) de 7,82 µg/mL. Porém, contra *A. fumigatus* o óleo não teve atividade, com CMI > 500 µg/mL.

Em contrapartida, o óleo mostrou-se ativo contra *Aspergillus fumigatus* no trabalho de Kumar et al. (2007). O óleo também exibiu um amplo espectro fungicida contra *A. niger*, *Botryodiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Macrophomina phaseolina*, *Cladosporium cladosporioides*, *Helminthosporium oryzae* e *Pythium debaryanum* na concentração de 100 µg/mL. Em adição, foi muito eficaz em inibir a produção de aflatoxina B1 produzida pela cepa produtora de aflatoxinas de *Aspergillus flavus*.

Jaramillo, Duarte e Delgado (2012) avaliaram a atividade do óleo das folhas e do caule sobre a inibição do crescimento micelar do fungo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. Dianthi. O óleo foi ativo com uma porcentagem de inibição micelar de 97,3% na dose de 177,7 µL de óleo/L de ar.

Em outra investigação, o óleo essencial das folhas de *Chenopodium ambrosioides* foi avaliado pela metodologia *poison food* e apresentou atividade antifúngica contra os fitopatógenos *Aspergillus flavus*, *A. glaucus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *Colletotrichum gloesporioides*, *C. musae*, *Fusarium oxysporum* e *F. semitectum*. Após fracionamento por cromatografia em camada delgada (CCD), bioensaio utilizando a técnica CCD bioautografia revelou a fração antifúngica do óleo. Os compostos dessa fração foram identificados por CG, CG-EM e cálculo do índice de retenção de Kováts (KI), sendo eles: (Z)-ascaridol (44,4%), (E)-ascaridol (30,2%) e *p*-cimeno (25,40%). Os autores sugeriram, então, que o ascaridol é o principal componente antifúngico do óleo (JARDIM et al., 2008).

Espécies de *Candida* foram sensíveis ao óleo essencial das folhas de *C. ambrosioides* em testes *in vitro*, sendo a atividade dose-dependente e com valores de CMI variando de 0,25 a 2 mg/mL. No teste *in vivo* em camundongos com candidíase vaginal, o tratamento com o óleo após 12 dias curou todos os camundongos e a atividade não foi dose-dependente (CHEKEM et al., 2010).

A combinação do óleo essencial das folhas de *C. ambrosioides* e *Cymbopogon martini*, assim como cada óleo separado, apresentou uma forte atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* contra dermatófitos e outros fungos filamentosos. As CMIs dos óleos e de sua combinação ficaram entre 150 e 500 ppm. Uma pomada preparada com os óleos e aplicada sobre micoses em porcos da Guiné reduziu significativamente a vermelhidão da pele, a gravidade da lesão e a presença de dermatófitos (PRASAD et al., 2010).

Atividade antiparasitária

O óleo essencial das partes aéreas de *C. ambrosioides* mostrou uma atividade promissora frente à *Trichomonas vaginallis*, com uma concentração inibitória mínima de 25 mg/mL (FIDALGO et al., 2004).

A atividade tripanocida do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* e de outras cinco espécies foi investigada por Borges et al. (2012). Todos os óleos testados mostraram efeito inibitório sobre as formas epimastigotas, sendo o de *C. ambrosioides* o mais efetivo, com IC₅₀ (concentração de inibição a 50%) de aproximadamente 21,3 µg/mL.

Monzote et al. (2007a) avaliaram a utilidade da combinação do óleo essencial das partes aéreas de *C. ambrosioides* com drogas usadas atualmente sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Foi verificada uma atividade sinérgica entre o

óleo e pentamidina. Contudo, foi encontrado um efeito indiferente na combinação com atimoniato de meglumina e com anfotericina B.

Diferentes rotas de administração do óleo essencial das partes aéreas da espécie em camundongos infectados com *Leishmania amazonensis* também foram estudadas. A administração do óleo por via intraperitoneal preveniu a lesão e diminuiu a carga parasitária nos camundongos. A administração oral retardou a infecção quando comparada com o grupo controle, mas foi menos efetiva do que a via intraperitoneal. A administração intralesional não mostrou atividade (MONZOTE et al., 2007b).

Atividade inseticida

O óleo essencial das folhas e caule de *Chenopodium ambrosioides* apresentou uma mortalidade de 100% na dose de 500 µL de óleo/L de ar, após 24 h de exposição contra o gorgulho-do-milho, *Sitophilus zeamais* Mots. (JARAMILLO; DUARTE; DELGADO, 2012). Os autores atribuíram a atividade inseticida à presença do α -terpineno, que foi o composto encontrado em maior porcentagem no óleo.

Analizando também a atividade de *C. ambrosioides* sobre o gorgulho-do-milho, Chu, Hu e Liu (2011) isolaram e identificaram cinco compostos ativos do óleo das partes aéreas da planta, sendo eles (Z)-ascaridol, 2-careno, p-cimeno, isoascaridol e α -terpineno, com destaque para a atividade inseticida do (Z)-ascaridol.

Tapondjou et al. (2002) encontraram que o efeito do óleo essencial das folhas de *C. ambrosioides* sobre a porcentagem de mortalidade de seis espécies de insetos após 24 h de exposição em discos de papel de filtro foi dose-dependente. Na dose de 0,2 µL/cm² a mortalidade foi maior do que 80% para todos os insetos, com exceção de *Callosobruchus maculatus* e *Sitophilus zeamais*. Neste caso, o gorgulho-do-milho foi o menos susceptível ao óleo, pois a mortalidade foi de apenas 5%.

Atividade alelopática

Jimenez-Osórnio, Kumamoto e Wasser (1996) avaliaram a atividade alelopática do óleo essencial das partes aéreas de *C. ambrosioides* sobre *Amaranthus hypochondriacus* L. O óleo inibiu tanto o crescimento do hipocótilo quanto a germinação de *A. hypochondriacus*. Através de CCD, foram obtidas cinco frações do óleo. A fração mais ativa foi submetida à análise espectral, sendo encontrado o ascaridol como principal aleloquímico.

Hegazy & Farrag (2007) compararam o efeito inibitório do óleo essencial das partes aéreas e de seus aleloquímicos (esteroides e terpenos) sobre a germinação e o crescimento das mudas de quatro espécies vegetais, foi constatado que os aleloquímicos provocam uma maior inibição do que o óleo. Estes aleloquímicos foram determinados através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) como sendo α -terpineno, limoneno e ascaridol.

Atividade citotóxica

Borges et al. (2012) compararam a atividade tripanocida e a toxicidade do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* para células mamíferas. O óleo não apresentou toxicidade contra as células mamíferas e ainda foi mais efetivo contra as formas tripomastigotas.

Em outro teste, utilizando células renais de macaco, também não foi verificada nenhuma toxicidade para o óleo essencial da espécie (CORREA-ROYERO et al., 2010).

Koba et al. (2009) avaliaram o potencial citotóxico do óleo essencial das folhas e inflorescências de *C. ambrosioides* e de seus quatro principais constituintes de origem comercial contra uma linhagem de queratinócitos humanos. O óleo essencial apresentou uma toxicidade moderada, com IC₅₀ de 700 μ L/mL. O padrão comercial puro neral mostrou a maior toxicidade, com IC₅₀ de 100 μ L/mL. Os outros padrões, geraniol, ascaridol e ρ -cimeno, aparentemente não foram tóxicos (IC₅₀ > 100 μ L/mL), mostrando o importante papel desempenhado pelo neral para a toxicidade geral do óleo.

Aspectos toxicológicos

De acordo com Gadano, Gurni e Carballo (2006), o óleo essencial de *C. ambrosioides* é irritante para a mucosa do trato gastrointestinal e possui efeitos genotóxicos. Gadano et al. (2002) relatam que os principais sintomas durante uma intoxicação aguda pelo óleo são gastroenterite com hiperemia difusa em primeiro lugar, seguido por alterações no sistema nervoso central (dor de cabeça, rubor facial, visão turva, vertigens, incoordenação motora e parestesia).

Monzote et al. (2007b) verificaram uma possível toxicidade do óleo essencial de *C. ambrosioides*, que foi administrado em camundongos infectados com *Leishmania amazonensis* pelas vias intraperitoneal, oral e intralesional. Foram examinados peritônio, baço, pâncreas, estômago, rim, fígado, as faces do diafragma, coração e pulmões. A

administração intraperitoneal causou pequenos abscessos na cavidade peritoneal, enquanto que as administrações via oral e intralesional não mostraram sinais de toxicidade. Os autores afirmam que a reduzida toxicidade do óleo essencial quando administrado por via oral facilita o tratamento a longo prazo e que, a fácil extração do óleo e a relação custo-efetividade com relação a outras drogas, são importantes considerações para levar em conta nos países em desenvolvimento.

CONCLUSÃO

Os dados da literatura revelam que o óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* é bastante promissor, apresentando diversas atividades biológicas. Porém, muito ainda precisa ser feito para identificar os compostos responsáveis pelas atividades exibidas e seus mecanismos de ação. Também são necessários mais estudos sobre os fatores que influenciam a composição do óleo, de forma isolada ou apresentando correlações, como sazonalidade, ritmo circadiano, temperatura, dentre outros, pois a variabilidade no teor dos constituintes majoritários e/ou ativos é uma das principais dificuldades de desenvolver fitoterápicos com reprodutibilidade de ação.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U. P. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the caatinga vegetation of NE Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 2, n. 30, 2006.
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. How ethnobotany can aid biodiversity conservation: reflections on investigations in the semi-arid region of NE Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 18, p. 127-150, 2009.
- ALENCAR, N. L. et al. The inclusion and selection of medicinal plants in traditional pharmacopoeias - evidence in support of the diversification hypothesis. **Economic Botany**, v. 64, n. 1, p. 68-79, 2010.
- ALMEIDA, N. F. L. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais na cidade de Viçosa – MG. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 4, p. 316-320, 2009.
- ALMEIDA, C. F. C. B. R. et al. A comparison of knowledge about medicinal plants for three rural communities in the semi-arid region of northeast of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 674-684, 2010.
- ALONSO-CASTRO, A. J. et al. Medicinal plants used in the Huasteca Potosina, México. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 292-298, 2012.
- ARISAWA, M. et al. Studies on unutilized resources. V. Components of the flavonoids in *Chenopodium* genus plants. 1. Flavonoids of *Chenopodium ambrosioides*. **Yakugaku Zasshi**, v. 91, n. 5, p. 522-524, 1971.
- BAHRMAN, N.; JAY, M.; GORENFLOT, R. Contribution to the chemosystematic knowledge of some species of the genus *Chenopodium*. **Lett Bot**, v. 2, p. 107-113, 1985.
- BAUER, L.; BRASIL, S. G. A. Essential oils of *Chenopodium ambrosioides* and *Schinus terebinthifolius* from Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 54, p. 240-242, 1973.
- BEZERRA, D. P. et al. Antitumor activity of the essential oil from the leaves of *Croton regelianus* and its component ascaridole. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, n. 8, p. 1224-1231, 2009.
- BLANCKAERT, I. et al. Ethnobotanical, morphological, phytochemical and molecular evidence for the incipient domestication of Epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.: Chenopodiaceae) in a semi-arid region of Mexico. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, p. 557-573, 2012.
- BORGES, A. R. et al. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 132, p. 123-128, 2012.
- CARNAT, A. P.; LAMAISON, J. L. Composition of the essential oil of *Artemisia molinieri* Quézel, Barbero et R. Loisel. **Journal of Essential Oil Research**, v. 4, n. 6, p. 635-637, 1992.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 326-342, 2010.

CAVALLI, J. F. et al. Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and ^{13}C -NMR spectroscopy: quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. **Phytochemical Analysis**, v. 15, n. 5, p. 275-279, 2004.

CHEKEM, M. S. G. et al. Antifungal properties of *Chenopodium ambrosioides* essential oil against *Candida* Species. **Pharmaceuticals**, v. 3, p. 2900-2909, 2010.

CHU, S. S.; HU, J. F.; LIU, Z. L. Composition of essential oil of chinese *Chenopodium ambrosioides* and insecticidal activity against maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Pest Management Science**, v. 67, p. 714-718, 2011.

CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v. 4, 1984.

CORREA-ROYERO, J. et al. In vitro antifungal activity and citotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 734-741, 2010.

DEL VALLE, J. M. et al. Recovery of natural antioxidants from boldo (*Peumus boldus* Molina) using conventional solvents and supercritical CO_2 extraction. **Food Research International**, v. 37, p. 695-702, 2004.

DEMBITSKY, V.; SHKROB, I.; HANUS, L. O. Ascaridole and related peroxides from the genus *Chenopodium*. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic**, v. 152, n. 2, p. 209-215, 2008.

FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 369-394, 2006.

FIDALGO, L. M. et al. Propiedades antiprotozoarias de aceites esenciales extraídos de plantas cubanas. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 56, n. 3, p. 230-233, 2004.

FRANÇA, F.; LAGO, E. L.; MARSDEN, P. D. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (viannia) braziliensis* in the endemic area of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, p. 229-232, 1996.

GADANO, A. et al. In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 11-16, 2002.

GADANO, A. B.; GURNI, A. A.; CARBALLO, M. A. Argentine folk medicine: genotoxic effects of Chenopodiaceae family. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 246-251, 2006.

GARCIA, D.; DOMINGUES, M. V.; RODRIGUES, E. Ethnopharmacological survey among migrants living in the Southeast Atlantic Forest of Diadema, São Paulo, Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 6, n. 29, 2010.

GBOLADE, A. A.; TIRA-PICOS, V.; NOGUERIA, J. M. F. Chemical constituents of *Chenopodium ambrosioides* L. var *anthelminticum* herb essential oil from Nigeria. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 46, n. 4, p. 654-655, 2010.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GUPTA, G. S.; BEHARI, M. Chemical investigation of *Chenopodium ambrosioides*. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 49, n. 3, p. 317-319, 1972.

GUPTA, D. et al. Chemical composition of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. from the southern hills of India. **Journal of essential Oil Research**, v. 14, p. 93-94, 2002.

HAJDU, Z.; HOHMANN, J. An ethnopharmacological survey of the traditional medicine utilized in the community of Porvenir, Bajo Paraguá Indian Reservation, Bolivia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 838-857, 2012.

HALLALA, A. et al. Evaluation of the analgesic and antipyretic activities of *Chenopodium ambrosioides* L. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**, v. 1, n. 4, p. 894-897, 2010.

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

HASEEB, A. et al. Evaluation of nematocidal property in certain alkaloid bearing plants. **Geobios**, v. 5, p. 116-118, 1978.

HEGAZY, A. K.; FARRAG, H. K. Allelopathic potential of *Chenopodium ambrosioides* on germination and seedling growth of some cultivated and weed plants. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 2, n. 1, p. 01-09, 2007.

HENRY, A. H.; PAGET, H. *Chenopodium* oil. Journal of the Chemical Society Transactions, In: SMILLIE, W. G.; PESSOA, S. B. A study of the anthelmintic properties of the constituents of the oil of *Chenopodium*. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 24, n. 5, p. 359-370, 1924.

JAIN, N. et al. Two flavonol glycosides from *Chenopodium ambrosioides*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 12, p. 2988-2991, 1990.

JARAMILLO, B. E.; DUARTE, E.; DELGADO, W. Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 17, n. 1, p. 54-64, 2012.

JARDIM, C. M. et al. Composition and antifungal activity of the essential oil of the brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, n. 9, p. 1213-1218, 2008.

JARDIM, C. M. et al. Chemical composition and antifungal activity of the hexane extract of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 10, p. 1814-1818, 2010.

JIMÉNEZ-OSORNIO, F. M. V. Z. J.; KUMAMOTO, J.; WASSER, C. Allelopathic activity of *Chenopodium ambrosioides* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 24, n. 3, p. 195-205, 1996.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 13. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.

JORGE, L. I. F.; FERRO, V. O.; KOSCHTSCHAK, M. R. W. Diagnose comparativa das espécies *Chenopodium ambrosioides* L. (erva-de-santa-maria) e *Coronopus didymus* (L.) Sm (mastruço) principais características morfo-histológicas e químicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, n. 2, p. 143-153, 1986.

KASALI, A. A. et al. 1,2:3,4-diepoxy-p-menthane and 1,4-epoxy-p-menth-2-ene: rare monoterpenoids from the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. var *ambrosioides* leaves. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. 1, p. 13-15, 2006.

KISMANN, K. G. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira, 1991. 608p.

KIUCHI, F. et al. Monoterpene hydroperoxides with trypanocidal activity from *Chenopodium ambrosioides*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 4, p. 509-512, 2002.

KLIKS, M. M. Studies on the traditional herbal anthelmintic *Chenopodium ambrosioides* L.: ethnopharmacological evaluation and clinical field trials. **Social Science & Medicine**, v. 21, n. 8, p. 879-886, 1985.

KOBA, K. et al. Chemical composition and cytotoxic activity of *Chenopodium ambrosioides* L. essential oil from Togo. **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 44, n. 4, p. 435-440, 2009.

KUMAR, R. et al. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 159-164, 2007.

LEVY, R. L. Oil of *Chenopodium* in the treatment of hookworm infections. **Journal of the American Medical Association**, v. 63, p. 1946-1949, 1914.

LIMA, J. L. S. et al. **Plantas medicinais de uso comum no Nordeste do Brasil**. Campina Grande, 2006. 81p.

LINDROTH, R. L.; HSIA, M. T. S.; SCRIBER, J. M. Seasonal patterns in the phytochemistry of three *Populus* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 15, p. 681-686, 1987.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Plantarum, 2002. 512p.

LUZIATELLI, G. et al. Asháninka medicinal plants: a case study from the native community of Bajo Quimiriki, Junín, Peru. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 6, n. 21, 2010.

MACDONALD, D. et al. Ascaridole-less infusions of *Chenopodium ambrosioides* contain a nematocide(s) that is(are) not toxic to mammalian smooth muscle. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, n. 2-3, p. 215-221, 2004.

MARTÍNEZ, G. J.; BARBOZA, G. E. Natural pharmacopoeia used in traditional Toba medicine for the treatment of parasitosis and skin disorders (Central Chaco, Argentina). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, p. 86-100, 2010.

MEDEIROS, M. F. T.; FONSECA, V. S.; ANDREATA, R. H. P. Plantas medicinais e seus usos pelos sitiantes da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 2, p. 391-399, 2004.

MONTEIRO, J. M. et al. Dynamics of medicinal plants knowledge and commerce in an urban ecosystem (Pernambuco, Northeast Brazil). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 178, p. 179-202, 2011.

MONZOTE, L. et al. Combined effect of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and antileishmanial drugs on promastigotes of *Leishmania amazonensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 4, p. 257-260, 2007a.

MONZOTE, L. et al. Activity, toxicity and analysis of resistance of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* after intraperitoneal, oral and intralesional administration in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*: A preliminary study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, n. 2-3, p. 148-153, 2007b.

MORAIS, S. M. et al. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 169-177, 2005.

MUHAYIMANA, A.; CHALCHAT, J. C.; GARRY, R. P. Chemical composition of essential oils of *Chenopodium ambrosioides* L. from Rwanda. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, p. 690-692, 1998.

NAPOLI, M. The plants, rituals and spells that 'cured' helminthiasis in Sicily. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 4, n. 21, 2008.

NOUMI, E.; YOMI, A. Medicinal plants used for intestinal diseases in Mbalmayo Region, Central Province, Cameroon. **Fitoterapia**, v. 72, n. 3, p. 246-254, 2001.

OKHALE, S. E. et al. Phytochemical and proximate analyses and thin layer chromatography fingerprinting of the aerial part of *Chenopodium ambrosioides* Linn. (Chenopodiaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 12, p. 2289-2294, 2012.

ONOCHA, P. A. et al. Essential oil constituents of *Chenopodium ambrosioides* L. leaves from Nigeria. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, p. 220-222, 1999.

PAGET, B. A. H. The determination of ascaridole in *Chenopodium* oil. **Analyst**, v. 51, p. 170-176, 1926.

PARÉ, P. W. et al. Antifungal Terpenoids from *Chenopodium ambrosioides*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 21, n. 6/7, p. 649-653, 1993.

PHARMACOPOEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL, 1. ed. São Paulo: Nacional. 1926.

PICÓ, B.; NUEZ, F. Minor crops of Mesoamerica in early sources (II). Herbs used as condiments. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 47, p. 541-552, 2000.

PINO, J.; MARBOT, R.; REAL, I. M. Essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. 3, p. 213-214, 2003.

PINTO, E. P. P.; AMOROZO, M. C. M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica - Itacaré, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 4, p. 751-762, 2006.

PRASAD, C. S. et al. In vitro and in vivo antifungal activity of essential oils of *Cymbopogon martini* and *Chenopodium ambrosioides* and their synergism against dermatophytes. **Mycoses**, v. 53, p. 123-129, 2010.

QUINLAN, M. B.; QUINLAN, R. J.; NOLAN, J. M. Ethnophysiology and herbal treatments of intestinal worms in Dominica, West Indies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, n. 1, p. 75-83, 2002.

RAMOS, U. F.; SOLEDADE, S. C.; BAPTISTA, E. R. Utilização de plantas medicinais pela comunidade atendida no Programa Saúde da Família da Pirajá, Belém, PA. **Infarma**, v. 24, n. 5/6, p. 10-18, 2011.

REHECHO, S. et al. Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Nor-Yauyos, a part of the Landscape Reserve Nor-Yauyos-Cochas, Peru. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 75-85, 2011.

RIBEIRO, A. et al. Ethnobotanical survey in Canhane village, district of Massingir, Mozambique: medicinal plants and traditional knowledge. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 6, n. 33, 2010.

SAGRERO-NIEVES, L.; BARTLEY, J. P. Volatile constituents from the leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, n. 2, p. 221-223, 1995.

SANTAYANA, M. P.; BLANCO, E.; MORALES, R. Plants known as té in Spain: An ethno-pharmaco-botanical review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 1-19, 2005.

SINGH, H. P. et al. Chemical composition of essential oil from leaves of *Chenopodium ambrosioides* from Chandigarh, India. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 44, n. 3, p. 378-379, 2008.

SMILLIE, W. G., PESSOA, S. B. A study of the anthelmintic properties of the constituents of the oil of *Chenopodium*. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 24, n. 5, p. 359-370, 1924.

SOUSA, M. P. et al. **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: Editora UFC, 2004. 448p.

SOUZA, C. D.; FELFILL, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso, Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 135-142, 2006.

TANPODJOU, L. A. et al. Efficacy of powder and essential oil from *Chenopodium ambrosioides* leaves as post-harvest grain protectants against six-stored product beetles. **Journal of Stored Products Research**, v. 38, p. 395-402, 2002.

TORRES, M. C. et al. Larvicidal and nematocidal activities of the leaf essential oil of *Croton regelianus*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, n. 12, p. 2724-2728, 2008.

VILA, R.; VALENZUELA, R.; BELLO, H. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Peumus boldus* leaves. **Planta Medica**, v. 65, p. 178-179, 1999.

VOLPATO, G. et al. Uses of medicinal plants by Haitian immigrants and their descendants in the Province of Camagüey, Cuba. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 5, n. 16, 2009.

4 Capítulo II

4.1 ANÁLISE MORFOANATÔMICA DE *Chenopodium
ambrosioides* L. (Chenopodiaceae)

4.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Chenopodium
ambrosioides* L. (Chenopodiaceae)

4.1 ANÁLISE MORFOANATÔMICA DE *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae)

4.1.1 Artigo I – Análise Morfoanatômica de *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae)

Artigo a ser submetido à Revista Brasileira de Farmacognosia

Rafaela D. Sá,¹ Asaph S. C. O. Santana,¹ Flávia C. L. Silva,² Luiz A. L. Soares,¹ Karina P. Randau*¹

¹Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Arthur de Sá, s/n, Cidade Universitária, 50740-521, Recife-PE, Brasil.

²Laboratório de Botânica Aplicada, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Olho Sítio d'Água da Bica, s/n, 58175-000, Cuité-PB, Brasil.

RESUMO: *Chenopodium ambrosioides* L., conhecida popularmente como mastruz, é uma erva muito utilizada no Brasil como anti-helmíntica e para gripe. Apesar do uso popular e do interesse medicinal, não há dados farmacognósticos para dar suporte à correta identificação da espécie. O objetivo deste trabalho foi descrever os principais caracteres anatômicos da raiz, caule, pecíolo e lâmina foliar de *C. ambrosioides*. Realizaram-se cortes à mão livre, de secções transversais, para análise microscópica da raiz, caule, pecíolo e lâmina foliar; bem como cortes paradérmicos e testes histoquímicos para lâmina foliar. Os principais caracteres úteis na identificação da planta foram: presença de idioblastos contendo areia cristalina no mesofilo, nervura principal e no parênquima de caule e pecíolo; presença de tricomas tectores e glandulares capitados na folha e no caule; e crescimento secundário derivado da sucessão de numerosos câmbios na raiz e no caule. Através dos testes histoquímicos, foi evidenciada a presença de substâncias lipofílicas, esteroides, óleo essencial e oleoresinas.

Palavras-chave: Chenopodiaceae, *Chenopodium ambrosioides*, histoquímica, mastruz, morfoanatomia

Introdução

A família Chenopodiaceae consiste de mais de 100 gêneros e 1400 espécies, com distribuição em todo o mundo (Joly, 2002). O gênero *Chenopodium* inclui diversas espécies nativas da Ásia, Europa e América (Kokanova-Nedialkova et al., 2010), utilizadas como alimento, condimento e/ou plantas medicinais, tais como *C. album* L., *C. berlandieri* ssp. *nutalliae* Saff., *C. quinoa* Willd. e *C. ambrosioides* L. (Blanckaert et al., 2012).

Chenopodium ambrosioides é popularmente conhecida como epazote, Mexican tea, American wormseed, paico, mastruz e erva-de-Santa-Maria (Kliks, 1985; Albuquerque et al., 2009). A espécie é uma erva nativa da América Central e do Sul, originária, provavelmente, do México. Tem crescimento espontâneo em regiões de clima tropical, subtropical (principalmente América e África) e temperado (desde o Mediterrâneo até a Europa Central) (Kismann, 1991). No Brasil é extensa a sua distribuição, com ocorrência em quase todo o território (Sousa et al., 2004; Lima et al., 2006).

As folhas são a parte da planta mais usada na medicina popular como anti-helmíntica e também como antifúngica (Fenner et al., 2006), para distúrbios digestivos, dores musculares e fraturas ósseas (Santayana et al., 2005; Garcia et al., 2010). No Nordeste do Brasil, onde a espécie é largamente usada, as folhas são batidas no liquidificador com leite para tratamentos de gripe (Morais et al., 2005). Em regiões endêmicas de leishmaniose, a população frequentemente utiliza suas folhas no tratamento tópico das úlceras provocadas pela doença (França et al., 1996).

Estudos fitoquímicos têm identificado flavonoides e terpenos como sendo os principais constituintes de *C. ambrosioides* (Jain et al., 1990; Kiuchi et al., 2002; Okhale et al., 2012). A planta está descrita na Farmacopeia Brasileira 1ª edição e sua monografia descreve o óleo essencial obtido por arraste a vapor (Farmacopoeia dos Estados Unidos do Brasil, 1926). O óleo essencial é constituído principalmente de monoterpenos, sendo o ascaridol o componente majoritário na maioria dos estudos. A propriedade anti-helmíntica da planta é atribuída à presença desse monoterpeno (Smillie & Pessoa, 1924; Gupta et al., 2002). Por isso, o óleo essencial de *C. ambrosioides* foi muito utilizado para tratar vermes no Brasil e no mundo entre os anos 1900 e 1920 (Levy, 1914; Smillie & Pessoa, 1924). Porém, entrou em desuso devido ao registro de alguns acidentes fatais, resultantes da ingestão de altas doses do óleo (Paget, 1926).

Várias atividades biológicas têm sido relatadas para *C. ambrosioides*, tais como antitumoral (Nascimento et al., 2006), antipirética e analgésica (Hallala et al., 2010),

antifúngica (Jardim, 2006), anti-helmíntica (Guimaraes et al., 2001) e leishmanicida (Monzote et al., 2007).

Devido aos estudos farmacológicos demonstrarem suas potencialidades terapêuticas e ao amplo e reconhecido uso popular, *Chenopodium ambrosioides* é uma das 71 espécies vegetais presentes na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), divulgada pelo Governo Brasileiro em 2009 (Brasil, 2009).

Os produtos obtidos de plantas são geralmente fabricados a partir de material seco, fragmentado e sem órgãos reprodutores, dificultando sua identificação através de morfologia externa. O estudo anatômico é uma importante ferramenta para a identificação de tal material (Metcalf & Chalk, 1972).

Este trabalho tem por objetivo descrever os principais caracteres anatômicos da raiz, caule, pecíolo e lâmina foliar de *C. ambrosioides*, a fim de subsidiar sua identificação e controle de qualidade, já que a planta não apresenta monografia nos códigos oficiais atuais.

Materiais e Métodos

Material vegetal

O material vegetal foi coletado na horta do Laboratório de Fitoterapia, da empresa Pernambuco Participações e Investimentos S/A (PERPART), localizada na cidade de Recife, estado de Pernambuco, Brasil. A exsicata foi depositada no herbário UFP-Geraldo Mariz, da Universidade Federal de Pernambuco - Brasil, sob o número 69.718.

Análise microscópica

Realizaram-se cortes em secções transversais na região mediana da raiz, caule, pecíolo e lâmina foliar de material fixado, à mão livre, usando lâmina comum de barbear e, como material de suporte, medula do pecíolo de embaúba (*Cecropia* sp.). As secções foram clarificadas com solução de hipoclorito de sódio a 50% e coradas com safranina e azul de astra (Johansen, 1940).

Secções paradérmicas foram realizadas nas faces adaxial e abaxial da folha fresca, à mão livre, usando lâmina comum de barbear, clarificadas com solução de hipoclorito de sódio a 50% e coradas com safranina e azul de astra (Johansen, 1940).

Posteriormente, foram confeccionadas lâminas histológicas semipermanentes, contendo secções transversais e paradérmicas do material botânico, seguindo procedimentos usuais em anatomia vegetal (Johansen, 1940; Sass, 1951).

Estômatos e tricomas foram classificados segundo Metcalfe & Chalk (1972).

Foram realizados testes histoquímicos em secções transversais de folhas frescas, à mão livre, com reagentes específicos: Sudam III para substâncias lipofílicas (Sass, 1951); cloreto férrico para compostos fenólicos (Johansen, 1940); tricloreto de antimônio para esteroides (Mace & Howell, 1974); reagente de Nadi para óleos essenciais (David & Carde, 1964); ácido clorídrico 10% para verificar a natureza dos cristais (Chamberlain, 1932).

As imagens digitais foram capturadas por microscópio óptico (*Alltion*) acoplado com câmera digital pelo programa *Toup View Image*.

Resultados

Aspectos macroscópicos

Chenopodium ambrosioides é uma erva que atinge até 1 m de altura, sendo bastante ramificada (Fig. 1A). As folhas são alternas, alongadas, com bordas denteadas, ápice agudo, pilosas (Fig. 1C, Fig. 1D), de tamanhos diversos, onde as menores ficam localizadas na parte superior da planta e são sésseis, as maiores ficam na parte inferior e apresentam pecíolo curto (Fig. 1B). Possuem cheiro forte e característico. A inflorescência é do tipo racemosa, apresentando flores pequenas, de cor verde. As sementes são numerosas, esféricas, de cor preta (Sousa et al., 2004; Lima et al., 2006).

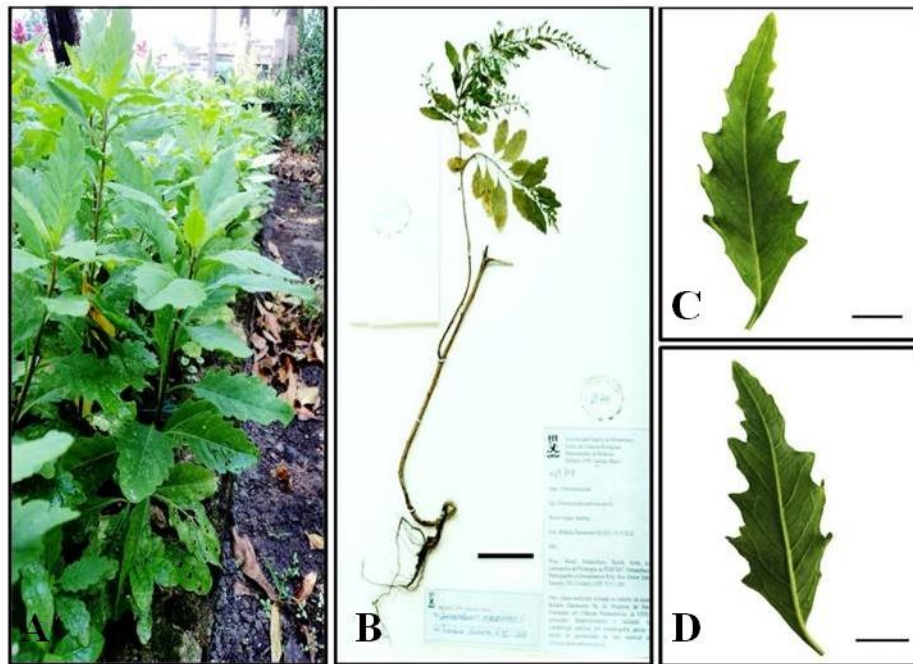


Figura 1. *Chenopodium ambrosioides* L., Chenopodiaceae. A. Hábito; B. Exsicata; C. Face adaxial da folha; D. Face abaxial da folha. (Barras: B = 5 cm; C, D = 2 cm).

Aspectos microscópicos

Descrição anatômica da raiz

A raiz apresenta epiderme uniestratificada e córtex com poucas camadas de tecido parenquimático (Fig. 2A). Observa-se também a formação de periderme (Fig. 2A) e de um crescimento secundário caracterizado por uma zona concêntrica de feixes vasculares colaterais distribuídos irregularmente que surge a partir de uma sucessão de arcos cambiais (Fig. 2B). O cilindro vascular possui estrutura triarca (Fig. 2C).

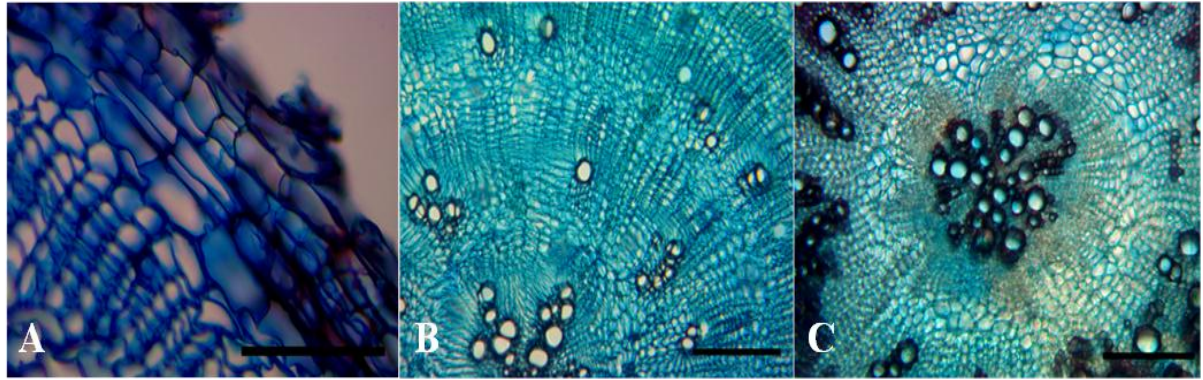


Figura 2. *Chenopodium ambrosioides* L., Chenopodiaceae – secção transversal da raiz. A. Epiderme e periderme; B. Crescimento secundário; C. Estrutura triarca do cilindro vascular. (Barras: A = 40 µm; B, C = 100 µm).

Descrição anatômica do caule

Em secção transversal, o caule apresenta-se poligonal, com cumes e depressões (Fig. 3A). Os tricomas estão localizados em toda a extensão do caule (Fig. 3B). Os tricomas tectores são multicelulares unisseriados com cabeça em forma de foice (Fig. 3C). Foi encontrado também um tricoma tector multisseriado (Fig. 3D). Os tricomas glandulares são de dois tipos: 1) glandular capitado com cabeça unicelular (Fig. 3E) e 2) glandular com corpo unisseriado curvado para a epiderme e com célula secretória distal arredondada (Fig. 3F).

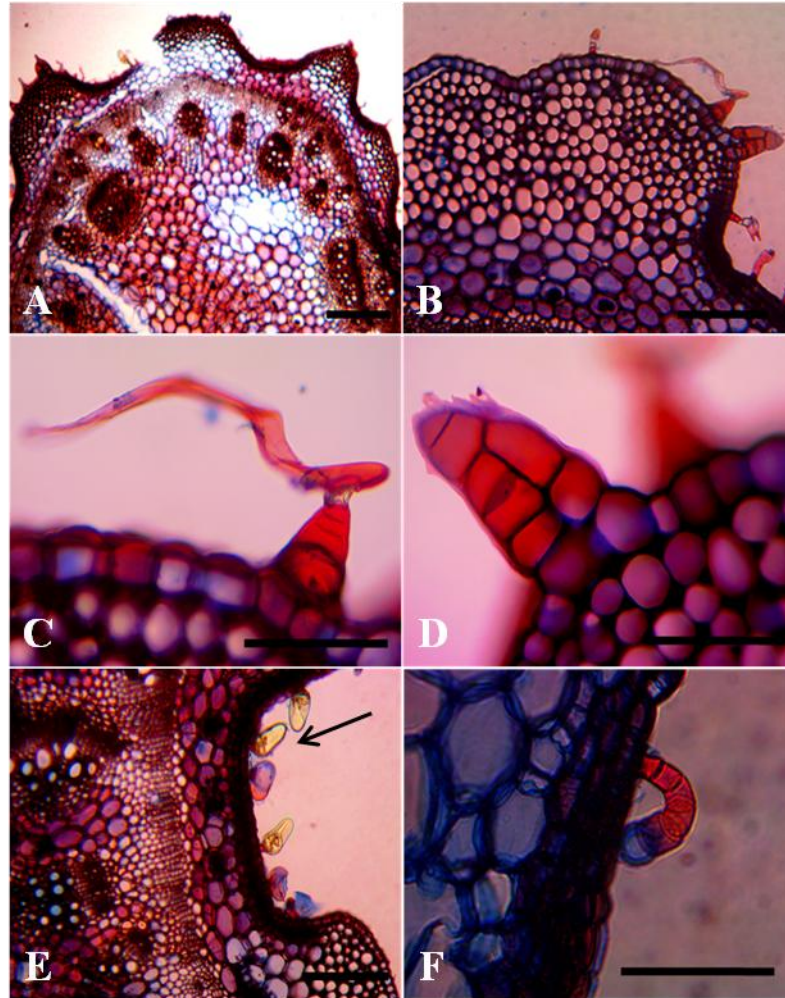


Figura 3. *Chenopodium ambrosioides* L., Chenopodiaceae – secção transversal do caule. A. Aspecto geral; B. Tricomas nas áreas de cume e depressão; C. Tricoma tector unisseriado com cabeça em forma de foice; D. Tricoma tector multisseriado; E. Tricomas glandulares capitados (seta) com cabeça unicelular; F. Tricoma glandular com corpo curvado para a epiderme e com célula secretória distal arredondada. (Barras: A = 200 μm ; B, E = 50 μm ; C, D, F = 20 μm).

A epiderme é constituída por uma única camada de células, revestida por cutícula delgada. Não se observa a formação de periderme (Fig. 4A). Nas depressões foram vistos vários estômatos (Fig. 4B). Nessas regiões, logo abaixo da epiderme, encontra-se a exoderme. Já nos cumes, o colênquima angular é que está localizado imediatamente abaixo da epiderme, sendo composto por quatro a nove camadas de células (Fig. 4A). No parênquima cortical estão presentes idioblastos contendo areia cristalina (Fig. 4C). Periciclo circunda toda a área de crescimento secundário, sendo este crescimento do mesmo tipo do que é encontrado na raiz, formado por uma sucessão de arcos cambiais. Distinguem-se duas zonas diferentes de

feixes vasculares: uma zona mais próxima à região cortical, na qual os feixes colaterais estão distribuídos formando uma faixa contínua (Fig. 4D); e outra zona mais próxima à região medular, na qual os feixes colaterais estão distribuídos descontinuamente, separados entre si por parênquima (Fig. 4D).

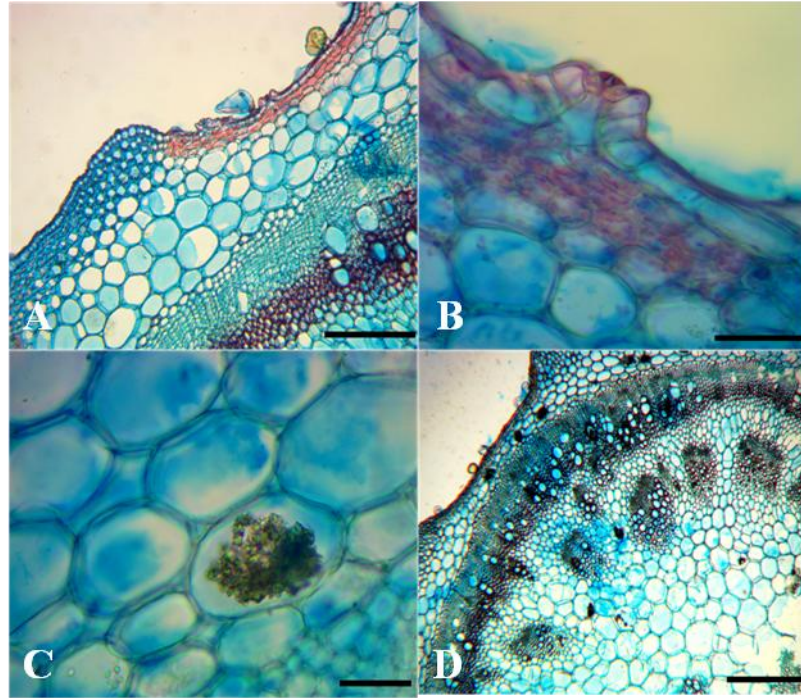


Figura 4. *Chenopodium ambrosioides* L., Chenopodiaceae – secção transversal do caule. A. Epiderme uniestratificada, exoderme e colênquima angular; B. Estômato; C. Idioblasto contendo areia cristalina no parênquima cortical; D. Crescimento secundário. (Barras: A, D = 500 μ m; B, C = 40 μ m).

Descrição anatômica do pecíolo

O pecíolo, em secção transversal, possui formato côncavo-convexo e apresenta alas laterais (Fig. 5A). A epiderme é uniestratificada (Fig. 5B), revestida por cutícula delgada, com tricomas glandulares com corpo unisseriado curvado para a epiderme e com célula secretória distal arredondada (Fig. 5B). O colênquima do tipo angular é observado em posição subepidérmica nas faces adaxial e abaxial, sendo formado por duas a três camadas de células. Este tecido também está presente nas alas laterais. Os feixes vasculares são do tipo colateral aberto e estão dispostos em semicírculo (Fig. 5C). Parênquima fundamental preenche todo o pecíolo, onde podem ser observados idioblastos contendo areia cristalina (Fig. 5D).

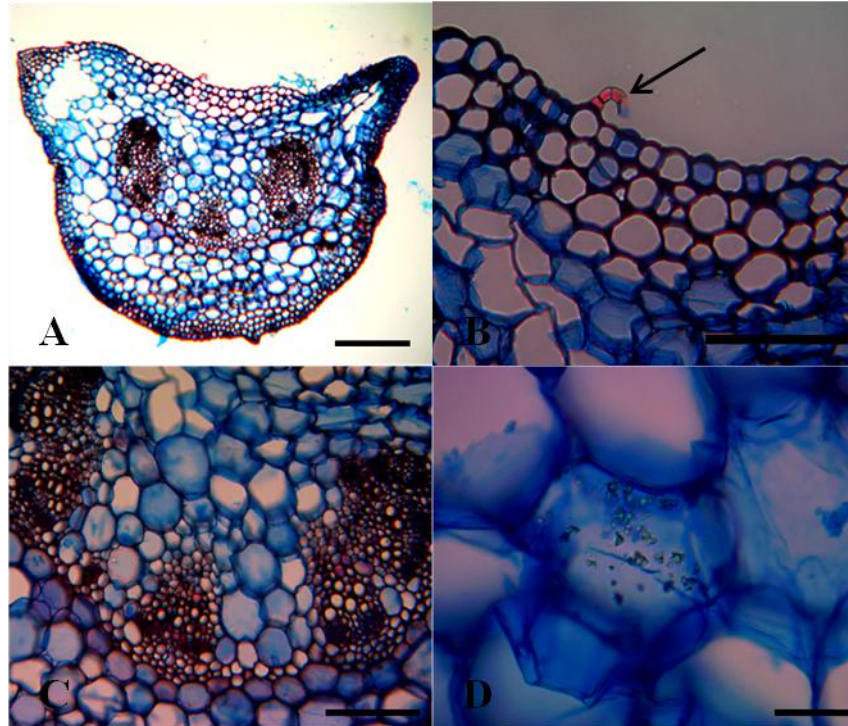


Figura 5. *Chenopodium ambrosioides* L., Chenopodiaceae – secção transversal do pecíolo. A. Aspecto geral; B. Epiderme uniestratificada, colênquima angular e tricoma glandular com corpo curvado para a epiderme (seta) na face abaxial; C. Feixes vasculares colaterais; D. Idioblasto com areia cristalina. (Barras: A = 200 μ m; B, C = 100 μ m; D = 40 μ m).

Descrição anatômica da lâmina foliar

A epiderme, em vista frontal, é constituída de células de paredes retas na face adaxial (Fig. 6A) e de paredes sinuosas na face abaxial (Fig. 6B). Os estômatos do tipo anomocítico estão presentes nas duas faces (Fig. 6A, Fig. 6B). Tricomas tectores ocorrem nas duas faces (Fig. 6C, Fig. 6D). São multicelulares unisseriados, sendo a célula da base arredondada e a célula terminal alongada, com a forma de uma foice. Tricomas glandulares também são encontrados nas duas faces, porém, em número bem maior na face abaxial. São dos mesmos tipos de tricomas que foram descritos no caule: glandular capitado com cabeça unicelular (Fig. 6E, Fig. 6F) e glandular com corpo unisseriado curvado para a epiderme e com célula secretória distal arredondada (Fig. 6E). Predominam os tricomas glandulares capitados.

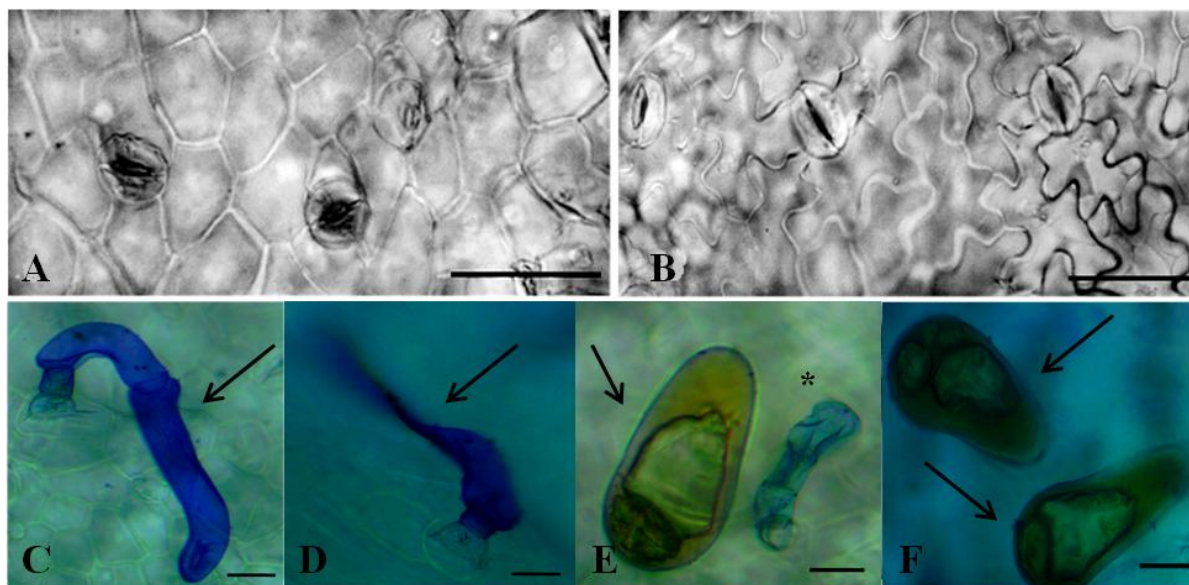


Figura 6. *Chenopodium ambrosioides* L., Chenopodiaceae – vista frontal da lâmina foliar. A. Células da epiderme com paredes retas e presença de estômatos na face adaxial; B. Células da epiderme com paredes sinuosas e estômatos na face abaxial; C. Tricoma tector (seta) na face adaxial; D. Tricoma tector (seta) na face abaxial; E. Tricoma glandular capitado (seta) e tricoma glandular (*) com corpo curvado para a epiderme na face adaxial; F. Tricomas glandulares capitados (setas) na face abaxial. (Barras: A, B = 40 μ m; C, D, E, F = 20 μ m).

Em corte transversal da lâmina foliar, observam-se tricomas tectores e glandulares (Fig. 7A, Fig. 7B). A epiderme é revestida por uma fina camada de cutícula. O mesofilo possui organização do tipo dorsiventral (Fig. 7C). É constituído por uma ou duas camadas de parênquima paliçádico e por parênquima lacunoso com células de tamanho e formas irregulares. Cavidades secretoras (Fig. 7C) e idioblastos contendo areia cristalina e drusas (Fig. 7C) foram encontrados no mesofilo.

A nervura principal apresenta secção transversal convexo-convexa. O sistema vascular é constituído por feixes colaterais abertos (Fig. 7D). Colênquima angular está presente em posição subepidérmica e também adjacente ao floema, externamente ao feixe vascular. Idioblastos contendo areia cristalina também foram observados na nervura principal (Fig. 7E).

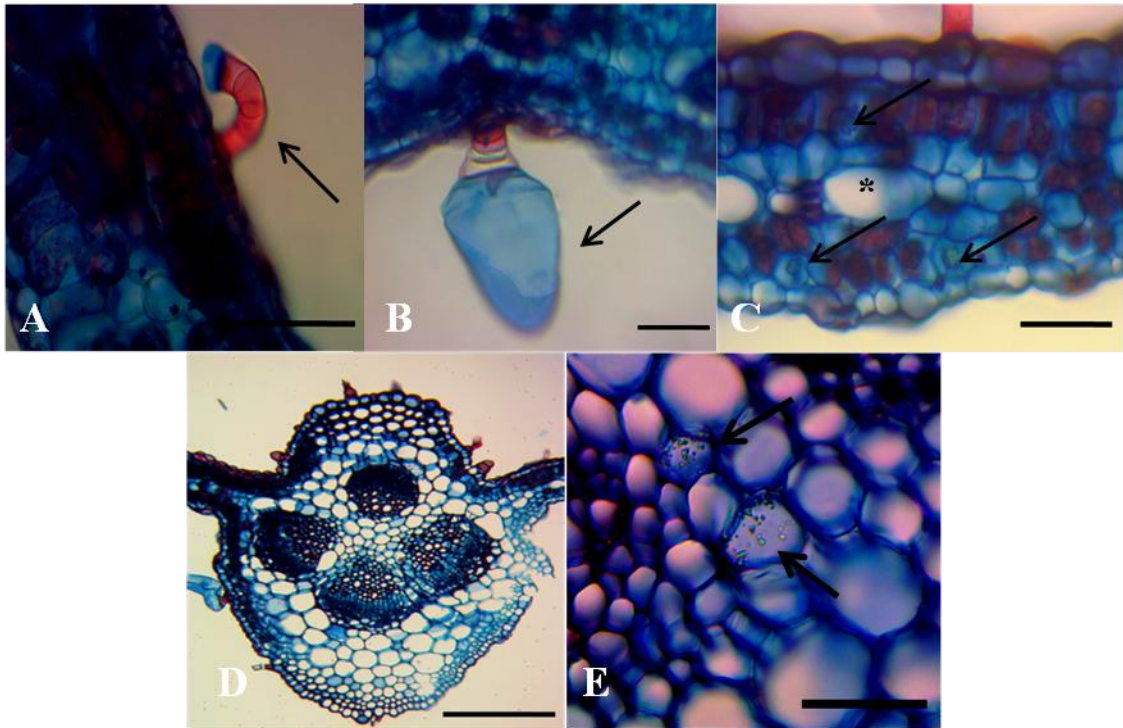


Figura 7. *Chenopodium ambrosioides* L., Chenopodiaceae – secção transversal da lâmina foliar. A. Tricoma glandular com corpo curvado para a epiderme (seta) na face abaxial; B. Tricoma glandular capitado (seta) na face abaxial; C. Aspecto geral do mesofilo, cavidade secretora (*) e drusas (setas); D. Aspecto geral da nervura principal; E. Idioblasto com areia cristalina (setas) na nervura principal. (Barras: A, B, C, E = 40 μ m; D = 100 μ m).

Em material fresco, o teste para detecção de lipídeos foi positivo, evidenciado pela coloração alaranjada. A presença de cutícula delgada ficou evidenciada (Fig. 8A) e substâncias lipofílicas foram encontradas nos tricomas glandulares, no colênquima da nervura principal (Fig. 8A) e no mesofilo, sendo mais evidente no parênquima paliçádico (Fig. 8B). Não foram evidenciados compostos fenólicos. As cores foram comparadas com um controle (Fig. 8C). O tricloreto de antimônio revelou a presença de esteroides no parênquima da nervura principal (Fig. 8D) e no interior de tricomas glandulares (Fig. 8E). O ácido clorídrico confirmou que os cristais são de oxalato de cálcio.

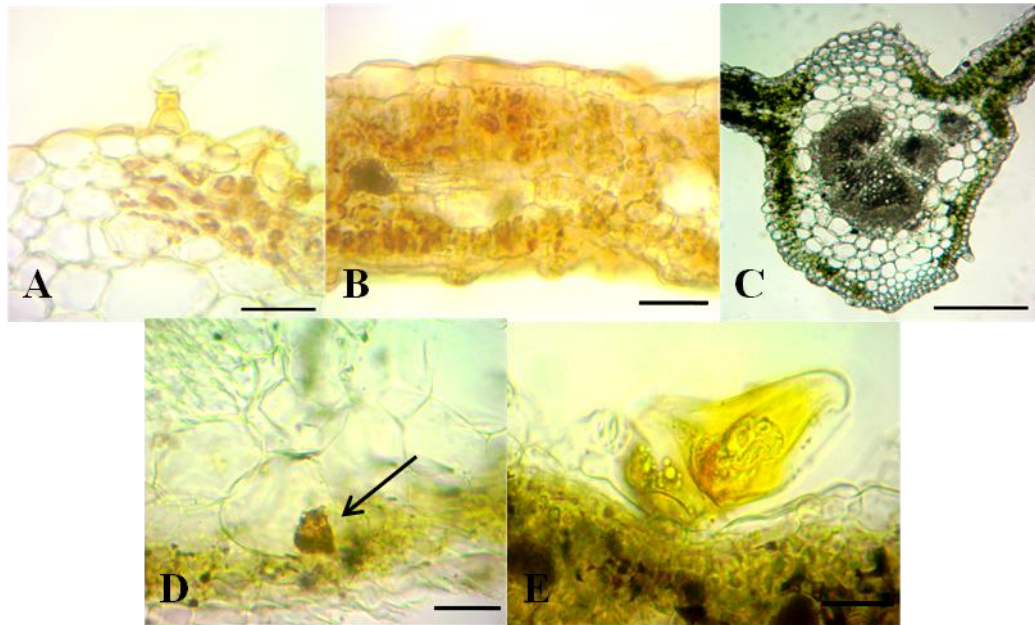


Figura 8. *Chenopodium ambrosioides* L., Chenopodiaceae – histoquímica. A. Sudam III na cutícula, tricoma glandular e no colênquima; B. Sudam III no mesofilo; C. Controle; D. Esteróide no parênquima (seta); E. Tricloreto de antimônio em tricoma glandular. (Barras: A, B, E, F = 40 μ m; C, D = 100 μ m).

O reagente de Nadi revelou os óleos essenciais corados de azul presentes nos tricomas glandulares (Fig. 9A), nas células da epiderme do mesofilo (Fig. 9A) e da nervura principal (Fig. 9B), e no interior de células do colênquima e parênquima na nervura principal (Fig. 9B). A cutícula também se cora de azul, provavelmente por ser constituída de substâncias lipofílicas. O reagente de Nadi evidencia, além dos óleos essenciais, a mistura de essências e ácidos resínicos, em uma coloração que varia do violeta ao púrpura (David & Carde, 1964). Observou-se a presença dessas substâncias de cor púrpura nos tricomas glandulares (Fig. 9C), no colênquima e parênquima da nervura principal (Fig 9B; Fig. 9D), assim como nas células da epiderme no mesofilo (Fig. 9E).

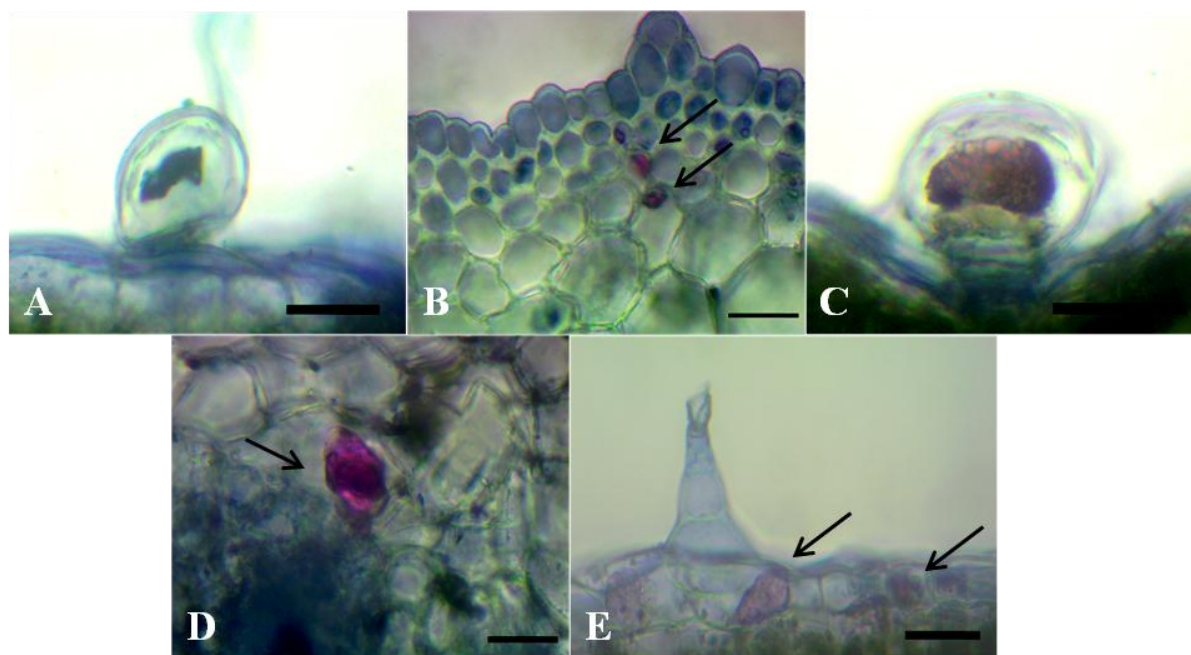


Figura 9. *Chenopodium ambrosioides* L., Chenopodiaceae – reagente de Nadi. A. Óleo essencial em tricoma glandular e em células da epiderme do mesofilo; B. Óleo essencial em células da epiderme, colênquima e parênquima da nervura principal; oleoresina no colênquima e parênquima da nervura principal (setas); C. Oleoresina no interior de tricoma glandular; D. Oleoresina no parênquima (seta); E. Oleoresina em células da epiderme no mesofilo. (Barras: A, B, C, D, E = 40 µm).

Discussão

A estrutura vascular encontrada na raiz foi do tipo triarca. Na família Chenopodiaceae também já foi reportado o tipo diarca, como descrito em outro estudo sobre *Chenopodium ambrosioides* (Holm, 1923) e em outros gêneros, tais como *Salsola* e *Kochia* (Phillips & Launchbaugh, 1958; Bercu & Bavaru, 2004).

A raiz e o caule de *C. ambrosioides* apresentam um crescimento secundário diferente do crescimento secundário típico da maioria das dicotiledôneas, onde a atividade do câmbio resultará na formação de um cilindro de células vasculares dispostos radialmente. No caso da família Chenopodiaceae, o crescimento secundário é considerado como sendo derivado da sucessão de numerosos câmbios que dão origem a vários feixes vasculares dispostos irregularmente (Metcalf & Chalk, 1950).

Com relação ainda ao crescimento secundário da planta, observa-se a formação de periderme na raiz, mas não no caule. A ausência de periderme no caule foi constatada em outras espécies de *Chenopodium*, incluindo *C. ambrosioides* (Bonzani et al., 2003).

A presença de tipos diferentes de tricomas em Chenopodiaceae foi registrada por alguns autores (Holm, 1923; Metcalfe & Chalk, 1972; Filho et al., 1992; Bonzani et al., 2003). Segundo Metcalfe & Chalk (1972), na família estão presentes tricomas unisseriados, ramificados, estrelados e tricomas glandulares capitados. No gênero *Chenopodium*, são mais comuns os tricomas tectores unisseriados e tricomas glandulares capitados. Ambos foram observados no caule e nas folhas de *C. ambrosioides*, mas também foram observados tricoma tector multisseriado no caule e tricomas glandulares com corpo unisseriado curvado para a epiderme e com célula secretória distal arredondada no caule e nas folhas. Estes dois últimos tipos de tricomas não são descritos por Metcalfe & Chalk (1972), entretanto, em um estudo detalhado dos tricomas do caule e das folhas de espécies de *Chenopodium*, Bonzani et al. (2003) citam todos os tipos de tricomas encontrados no presente trabalho, e ainda outros, os quais são relacionados por tipos e subtipos de tricomas tectores e tricomas glandulares.

Há também uma controvérsia com relação à presença dos tricomas glandulares nas faces da lâmina foliar de *C. ambrosioides*. Assim como foi visto nesse trabalho, a presença em ambas as faces também foi identificada por Holm (1923) e Bonzani et al. (2003) em *C. ambrosioides*, e por Filho et al. (1992) em *C. retusum* Juss. ex Moq. Jorge et al. (1986) afirmam que os tricomas glandulares predominam na face superior, o que difere de Costa & Tavares (2006), que relataram estes tricomas restritos à face abaxial.

O padrão de organização do sistema vascular do pecíolo de *C. ambrosioides* está de acordo com as observações de Metcalfe & Chalk (1972) para *C. bonus-henricus*. A presença de alas laterais já foi observada por Costa & Tavares (2006), em cortes nas regiões proximal, mediana e distal do pecíolo. Os mesmos autores relatam a presença de tricomas tectores e glandulares capitados no pecíolo, porém, em nosso trabalho foi verificado apenas o tipo de tricoma glandular com corpo unisseriado curvado para a epiderme e com célula secretória distal arredondada, semelhante ao encontrado no caule e nas folhas.

Folhas anfiestomáticas são características da família Chenopodiaceae (Metcalfe & Chalk, 1972), como confirmado na espécie estudada e em outras, como em *C. album* e *C. hircinum* (Moris et al., 1996). Estômatos anomocíticos são os mais frequentes, mas também são encontrados estômatos anisocíticos em *C. chilense* e tetracíticos em *C. multifidum* (Bonzani et al., 2003).

A maioria das espécies de Chenopodiaceae apresenta mesofilo dorsiventral, o que comprova o encontrado para *C. ambrosioides*. Há algumas exceções, como *C. retusum*, *C. oblongeolatum* (Bonzani et al., 2003) e *Salsola* sp. (Metcalfe & Chalk, 1972), que apresentam mesofilo isobilateral.

Idioblastos contendo areia cristalina foram encontrados frequentemente no mesofilo, nervura principal, pecíolo e caule. A confirmação, através de teste com ácido clorídrico, de que os cristais são de oxalato de cálcio corrobora o resultado de Costa & Tavares (2006). Segundo Metcalfe & Chalk (1972), a ocorrência desses cristais de areia confere importante valor diagnóstico para a espécie, pois os mesmos são bastante restritos entre as dicotiledôneas.

Costa & Tavares (2006) também relataram a presença de substâncias lipofílicas utilizando Sudam III. Não há relatos na literatura, entretanto, para a presença de esteroides, através de teste com tricloreto de antimônio, e de oleoresinas, utilizando reagente de Nadi.

Por meio deste estudo observou-se que a raiz, caule, pecíolo e lâmina foliar de *Chenopodium ambrosioides* apresentam características anatômicas que são úteis na identificação da planta, as quais foram: presença de idioblastos contendo areia cristalina no mesofilo, nervura principal e no parênquima de caule e pecíolo; presença de tricomas tectores e glandulares capitados na folha e no caule; e crescimento secundário derivado da sucessão de numerosos câmbios na raiz e no caule. Além de contribuir significativamente para o conhecimento da morfoanatomia, também foi possível ver a histolocalização dos principais grupos de metabólitos secundários presentes nas folhas da espécie.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq (132722/2011-9) pelo apoio financeiro na forma de subsídios e bolsa de estudo. Agradecem também a PERPART pelo fornecimento do material vegetal.

Contribuições dos autores

Rafaela D. Sá contribuiu na coleta da planta, confecção da exsicata, executando o trabalho de laboratório, análise dos dados e elaboração do manuscrito. Asaph S. C. O. Santana contribuiu com o estudo morfoanatômico e histoquímico. Flávia C. L. Silva contribuiu com a leitura crítica do manuscrito. Luiz A. L. Soares e Karina P. Randau elaboraram o estudo, supervisionaram o trabalho de laboratório e contribuíram com a leitura crítica do manuscrito. Todos os autores leram o manuscrito final e aprovaram a submissão.

Referências

- Albuquerque UP, Araújo TAS, Ramos MA, Nascimento VT, Lucena RFP, Monteiro JM, Alencar NL, Araújo EE 2009. How ethnobotany can aid biodiversity conservation: reflections on investigations in the semi-arid region of NE Brazil. *Biodivers Conser* 18: 127-150.
- Bercu R, Bavaru E 2004. Anatomical aspects of *Salsola kali* subsp. *ruthenica* (Chenopodiaceae). *Phytol Balcan* 10: 227-232.
- Blanckaert I, Paredes-Flores M, Espinosa-García FJ, Piñero D, Lira R 2012. Ethnobotanical, morphological, phytochemical and molecular evidence for the incipient domestication of Epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.: Chenopodiaceae) in a semi-arid region of Mexico. *Genet Resour Crop Evol* 59: 557-573.
- Bonzani NE, Barboza GE, Bugatti MA, Ariza Espinar L 2003. Morpho-histological studies in the aromatic species of *Chenopodium* from Argentina. *Fitoterapia* 74: 207-225.
- Brasil. Ministério da Saúde 2009. *Plantas de interesse ao SUS*. http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30277&janela=1, access in may 2012.
- Chamberlain CJ 1932. *Methods in plant histology*. 5. ed. Chicago: University of Chicago Press.
- Costa MVL, Tavares ES 2006. Anatomia foliar de *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) – erva-de-Santa-Maria. *Rev Bras Pl Med* 8: 63-71.
- David R, Carde JP 1964. Coloration différentielle des pseudophylles de Pin maritime au moyen du reactif de Nadi. *C R Acad Sci Paris ser D* 258: 1338-1340.
- Fenner R, Betti AH, Mentz LA, Rates SMK 2006. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Rev Bras Cienc Farm* 42: 369-394.
- Filho FAS, Oliveira PL, Mariath JEA 1992. Tricomas de *Chenopodium retusum* Juss. ex Moq. *Insula* 21: 43-58.
- França F, Lago EL, Marsden PD 1996. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (viannia) braziliensis* in the endemic area of Bahia, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 29: 229-232.
- Garcia D, Domingues MV, Rodrigues E 2010. Ethnopharmacological survey among migrants living in the southeast atlantic forest of Diadema, São Paulo, Brazil. *J Ethnobiol Ethnomed* 6: 29.
- Guimaraes DL, Llanos RSN, Acevedo JHR 2001. Ascariasis: comparison of the therapeutic efficacy between paico and albendazole in children from Huaraz. *Rev Gastroenterol Perú* 21: 212-219.
- Gupta D, Charles R, Mehta VK, Garg SN, Kumar S 2002. Chemical composition of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. from the southern hills of India. *J Essent Oil Res* 14: 93-94.
- Hallala A, Benalia S, Markouk M, Bekkouchea K, Larhsinia M, Chaitb A, Romanec A, Abbada A, El Abdounid MK 2010. Evaluation of the analgesic and antipyretic activities of *Chenopodium ambrosioides* L. *Asian J Exp Biol Sci* 1: 894-897.
- Holm T 1923. *Chenopodium ambrosioides* L. a morphological study. *Amer J Sci* 6: 157-167.
- Jain N, Alam MS, Kamil M, Ilyas M, Niwa M, Sakae A 1990. Two flavonol glycosides from *Chenopodium ambrosioides*. *Phytochemistry* 29: 2988-2991.
- Jardim CM 2006. *Composição e atividade antifúngica de extratos de Chenopodium ambrosioides* L. Viçosa, 83p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa.
- Johansen DA 1940. *Plant microtechnique*. New York: Mcgraw-Hill.

- Joly AB 2002. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 13. ed. São Paulo: Companhia Editora.
- Jorge LIF, Ferro VO, Koschtschak MRW 1986. Diagnose comparativa das espécies *Chenopodium ambrosioides* L. (erva-de-santa-maria) e *Coronopus didymus* (L.) Sm (mastruço) principais características morfo-histológicas e químicas. *Rev Bras Farmacogn* 1: 143-153.
- Kismann KG 1991. *Plantas Infestantes e Nocivas*. São Paulo: BASF Brasileira.
- Kiuchi F, Itano Y, Uchiyama N, Honda G, Tsubouchi A, Nakajima-Shimada J, Aoki T 2002. Monoterpene hydroperoxides with trypanocidal activity from *Chenopodium ambrosioides*. *J Nat Prod* 65: 509-512.
- Kliks MM 1985. Studies on the traditional herbal anthelmintic *Chenopodium ambrosioides* L.: ethnopharmacological evaluation and clinical field trials. *Soc Sci Med* 21: 879-886.
- Kokanova-Nedialkova Z, Nedialkov PT, Nikolov SD 2010. The genus *Chenopodium*: phytochemistry, ethnopharmacology and pharmacology. *Phcog Rev* 3: 280-306.
- Levy RL 1914. Oil of *Chenopodium* in the treatment of hookworm infections. *Jour Amer Med Assoc* 63: 1946-1949.
- Lima JLS, Furtado DA, Pereira JPG, Baracuthy JGV, Xavier HS 2006. *Plantas medicinais de uso comum no Nordeste do Brasil*. Campina Grande.
- Mace MZ, Howell CR 1974. Histochemistry and identification of condensed tannin precursors in roots of cotton seedlings. *Can J Bot* 52: 2423-2426.
- Metcalfe CR, Chalk L 1950. *Anatomy of the dicotyledons*. Oxford: Clarendon Press.
- Metcalfe CR, Chalk L 1972. *Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Oxford: Clarendon Press.
- Monzote L, Montalvo AM, Scull R, Miranda M, Abreu J 2007. Activity, toxicity and analysis of resistance of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* after intraperitoneal, oral and intralesional administration in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*: A preliminary study. *Biomed Pharmacother* 61: 148-153.
- Morais SM, Dantas JDP, Silva ARA, Magalhães EF 2005. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. *Rev Bras Farmacogn* 15: 169-177.
- Moris M, Gonzalez JA, Gallardo M, Prado FE 1996. Anatomical and functional differences and nyctinastic leaf movements in *Chenopodium album* L. and *Chenopodium hircinum* Schrad. (Chenopodiaceae). *Bot J Linn Soc* 121: 133-141.
- Nascimento FRF, Cruz GVB, Pereira PVS, Maciel MCG, Silva LA, Azevedo APS, Barroqueiro ESB, Guerra RNM, 2006. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. *Life Sci* 78: 2650-2653.
- Okhale SE, Egharevba HO, Ona EC, Kunle OF 2012. Phytochemical and proximate analyses and thin layer chromatography fingerprinting of the aerial part of *Chenopodium ambrosioides* Linn. (Chenopodiaceae). *J Med Plants Res* 6: 2289-2294.
- Paget BAH 1926. The determination of ascaridole in *Chenopodium* oil. *Analyst* 51: 170-176.
- Pharmacopoeia dos Estados Unidos do Brasil* 1926. 1. ed. São Paulo: Nacional.
- Phillips WM, Launchbaugh JL 1958. Preliminary studies of the root system of *Kochia scoparia* at Hays, Kansas. *Weeds* 6: 19-23.
- Santayana MP, Blanco E, Morales R 2005. Plants known as té in Spain: An ethno-pharmacobotanical review. *J Ethnopharmacol* 98: 1-19.
- Sass JE 1951. *Botanical microtechnique*. 2. ed. Ames: Iowa State College Press.
- Smillie WG, Pessoa SB 1924. A study of the anthelmintic properties of the constituents of the oil of *Chenopodium*. *J Pharm Exp Ther* 24: 359-370.
- Sousa MP, Matos MEO, Matos FJA, Machado MIL, Craveiro AA 2004. *Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras*. Fortaleza: Editora UFC.

4.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae)

4.2.1 Prospecção fitoquímica e quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae)

INTRODUÇÃO

Chenopodium ambrosioides L., conhecida popularmente como mastruz, epazote e Mexican tea, é uma erva da família Chenopodiaceae (KLIKS, 1985; ALBUQUERQUE et al., 2009). Está amplamente distribuída ao longo da América, África e também em países da Europa (KISMANN, 1991).

A espécie tem sido utilizada pela população principalmente como anti-helmíntica e para tratamentos de gripe (MORAIS et al., 2005; BLANCKAERT et al., 2012). No Brasil, as folhas são a parte da planta mais usada na medicina popular e, geralmente, são misturadas com leite para a ingestão (MORAIS et al., 2005). A planta também é tradicionalmente utilizada como antifúngica (FENNER et al., 2006), para distúrbios digestivos (SANTAYANA; BLANCO; MORALES, 2005), dores de estômago (ALONSO-CASTRO et al., 2012), cólicas (LUZIATELLI et al., 2010), como antibiótico e expectorante (SOUZA; FELFILI, 2006) e no tratamento tópico de úlceras provocadas por leishmaniose (FRANÇA; LAGO; MARSDEN, 1996).

O óleo essencial das folhas é o componente mais conhecido da planta e várias investigações sobre sua composição (JARDIM et al., 2008; JARAMILLO; DUARTE; DELGADO, 2012) e atividades biológicas já foram reportadas na literatura, tais como antifúngica (CORREA-ROYERO et al., 2010), antiparasitária (BORGES et al., 2012) e antioxidante (KUMAR et al., 2007). Entretanto, ainda são raros os estudos relacionados à composição química de *C. ambrosioides*, os quais são importantes para o conhecimento de outros grupos de metabólitos secundários relevantes na mesma.

A presente pesquisa teve como objetivo realizar uma triagem fitoquímica e determinar o teor de flavonoides totais nas folhas de *C. ambrosioides*, através de espectrofotometria no ultravioleta-visível.

MATERIAIS E MÉTODOS

Prospecção fitoquímica

Cerca de 3 g de folhas frescas de *Chenopodium ambrosioides* foram submetidas à infusão metanólica a 10% (v/v), sob agitação durante 30 min, para prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada (CCD). Aplicaram-se alíquotas do extrato metanólico em placas cromatográficas de gel de sílica (Macherey-Nagel, Alugram® Sil G/UV₂₅₄), empregando-se diversos sistemas eluentes e reveladores adequados (RANDAU et al., 2004), listados na Tabela 1. Para pesquisa de saponinas, realizou-se um teste de afrogenicidade, através de forte agitação das soluções, por cerca de 30 s, seguida de repouso. A formação de espuma abundante e persistente por mais de 15 min foi o critério usado para avaliar a presença de saponósidos (COSTA, 2001).

Tabela 1 – Sistemas cromatográficos utilizados para a caracterização química do extrato de *Chenopodium ambrosioides*.

METABÓLITOS	FASE MÓVEL	REVELADOR	REFERÊNCIA
Alcalóides	AcOEt-HCOOH-AcOH- H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Dragendorff	(WAGNER; BLADT, 1996)
Polifenóis	AcOEt-HCOOH-AcOH- H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	NEU	(NEU, 1956; WAGNER; BLADT, 1996)
Açúcares redutores	AcOEt-HCOOH-AcOH- H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Cloreto de trifeniltetrazólio	(METZ, 1961)
Taninos condensados	AcOEt-HCOOH-AcOH- H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Vanilina clorídrica	(ROBERTS; CARTWRIGHT; OLDSCHOOL, 1957)
Taninos hidrolisáveis	BuOH-AcOH- H ₂ O (4:1:5 v/v)	NEU	(XAVIER, 1988)
Triterpenos e esteróides	Tolueno-AcOEt (90:10 v/v)	Liebermann/Burchard	(HARBONE, 1998)
Monoterpenos e sesquiterpenos	Tolueno-AcOEt (97:3 v/v)	Vanilina sulfúrica	(WAGNER; BLADT, 1996)

AcOEt = acetato de etila; HCOOH = ácido fórmico; AcOH = ácido acético; H₂O = água; BuOH = butanol; NEU = ácido etilborilaminoéster a 1% em etanol.

Doseamento de flavonoides

Na preparação do material vegetal, as folhas de *Chenopodium ambrosioides* foram submetidas à secagem a temperatura ambiente por 10 dias e, em seguida, pulverizadas em moinho industrial.

Preparo da solução extrativa

A solução extrativa foi obtida através de extração sob refluxo com solução hidroalcoólica (50% v/v), baseando-se em metodologia previamente descrita (PETRY et al., 1998). A extração foi realizada em balão de fundo redondo contendo 0,5 g do material vegetal e 30 mL de solução hidroalcoólica, por 30 min. O extrato foi filtrado em algodão, sendo o resíduo (algodão e material vegetal) re-extraído por mais duas vezes, durante 30 min. As frações filtradas foram reunidas em balão volumétrico (100 mL) e o volume ajustado com a solução hidroalcoólica.

Determinação do teor de flavonoides totais

Alíquotas da solução extrativa foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, onde se adicionou 2 mL de solução etanólica de AlCl_3 (5% m/v). Ajustou-se o volume, em seguida, com a solução hidroalcoólica (50% v/v). Após 30 min da adição da solução etanólica de AlCl_3 (5% m/v), as amostras foram submetidas à varredura em espectrofotômetro na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) (*UV-Visible Spectrophotometer Evolution 60S - Thermo Scientific*), na faixa de 200 a 500 nm, para identificação da diluição e do comprimento de onda que apresentassem o valor de absorbância mais adequado para o método, de acordo com a lei de Lambert-Beer (SOARES et al., 2003). Utilizou-se como branco uma solução de compensação, preparada do mesmo modo que as amostras, mas sem a adição da solução etanólica de AlCl_3 (5% m/v). O cálculo do teor de flavonoides totais (TFT), expresso em porcentagem (p/p) de quercetina, foi determinado tomando como referência a absortividade específica de 500 (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

RESULTADOS

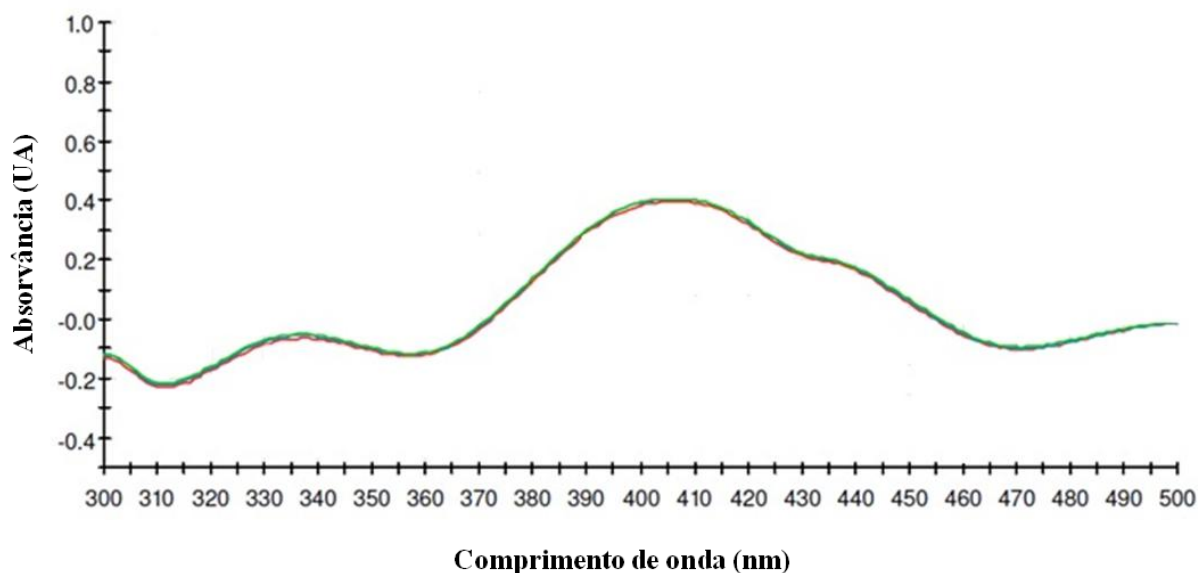
Prospecção fitoquímica

A prospecção fitoquímica, através de CCD e teste de afrogenicidade, demonstrou a presença de flavonoides glicosilados, açúcares redutores, monoterpênos e sesquiterpênos, triterpênos e esteroides. No teste de afrogenicidade, houve formação de espuma, mas a mesma não foi persistente por mais de 15 min, desconsiderando-se, então, a presença de saponinas.

Doseamento de flavonoides

Na quantificação em UV-Vis, o comprimento de onda máximo encontrado foi em 405 nm (Figura 1) e o teor de flavonoides totais calculado na amostra de *Chenopodium ambrosioides* foi de $1,61 \pm 0,02$ (1,51%).

Figura 1 – Espectro de varredura do extrato de *Chenopodium ambrosioides*.



Fonte: autor próprio

DISCUSSÃO

O perfil fitoquímico da amostra revelou a presença de açúcares, flavonoides e terpenos. A presença desses metabólitos se encontra em consonância com os dados da literatura pertinente (JORGE; FERRO; KOSCHTSCHAK, 1986; HEGAZY; FARRAG, 2007; ALENCAR et al., 2010; HALLALA et al., 2010; OKHALE et al., 2012). No entanto, observou-se divergência em relação à presença de alcaloides (HASEEB et al., 1978; HEGAZY; FARRAG, 2007; HALLALA et al., 2010; OKHALE et al., 2012), taninos (ALENCAR et al., 2010; HALLALA et al., 2010) e saponinas (GUPTA; BEHARI, 1972; OKHALE et al., 2012).

Em contrapartida, a ausência dessas três últimas classes de metabólitos também é reportada, assim como encontrado neste trabalho. Os testes para taninos e saponinas foram negativos nos trabalhos de Hegazy e Farrag (2007) e Jorge, Ferro e Koschtschak (1986). Alcaloides não foram detectados por Jorge, Ferro e Koschtschak (1986) e Alencar et al. (2010). As divergências em análises fitoquímicas podem ser atribuídas a alguns fatores, como período de coleta, equívocos em relação à autenticidade do material vegetal e método de extração (SIMÕES et al., 2004). Além disso, o acúmulo de metabólitos secundários na planta também sofre a influência de diversos fatores, como sazonalidade, idade e desenvolvimento da planta, temperatura, nutrientes, disponibilidade hídrica, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos, dentre outros (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Pode-se citar, por exemplo, o local de coleta da planta como um dos fatores que ocasionou as diferenças dos resultados encontrados com a literatura. As análises de Okhale et al. (2012), que encontraram saponinas e alcaloides, foram realizadas com planta coletada na Nigéria. Já com relação à ausência de alcaloides, os dois trabalhos que estão de acordo os resultados apresentados no presente estudo também foram realizados com material coletado no Brasil (JORGE; FERRO; KOSCHTSCHAK, 1986; ALENCAR et al., 2010), um deles sendo no estado de Pernambuco.

A existência de terpenos e flavonoides é relevante e coloca a espécie dentre as demais que são promissoras fontes de estudos fitoquímicos e farmacológicos. O interesse econômico pelo grupo dos flavonoides advém de suas diferentes aplicações no campo industrial e pela diversidade de ações terapêuticas demonstradas pela comunidade científica (HAVSTEEN, 2002). São também importantes marcadores analíticos para o controle de qualidade de drogas vegetais (PETRY et al., 2001). Para a realização desse controle, há uma variedade de métodos

descritos na literatura para a quantificação dos flavonoides, destacando-se a técnica de espectrofotometria de absorção na região do UV-Vis (KOMAROVA et al., 2009).

Essa técnica é o método comumente empregado para quantificar flavonoides em materiais vegetais, devido à sua simplicidade, baixo custo de execução e ampla disponibilidade nos laboratórios de controle de qualidade (CHABARIBERI et al., 2008; KOMAROVA et al., 2009). Utilizando o método colorimétrico com cloreto de alumínio, foi possível determinar os flavonoides sem a interferência de outros compostos fenólicos, que podem apresentar bandas de absorção similares as dos flavonoides, ocasionando a sobreposição das bandas e impedindo a absorção do composto de interesse (SOUZA; GIOVANI, 2005; PETRY et al., 1998; PETRY; ORTEGA; SILVA, 2001).

O método desenvolvido para o doseamento dos flavonoides totais em *Chenopodium ambrosioides* mostrou-se simples e eficaz, ficando a perspectiva da realização da validação da metodologia, que é de fundamental importância para o controle de qualidade de produtos acabados.

CONCLUSÃO

A prospecção fitoquímica forneceu informações relevantes acerca da presença de metabólitos secundários nas folhas de *C. ambrosioides*, para que assim seja possível chegar ao isolamento de princípios ativos importantes na produção de novos fitoterápicos. Além disso, foi possível calcular o teor de flavonoides totais através de um método espectrofotométrico simples e eficaz.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U. P. et al. How ethnobotany can aid biodiversity conservation: reflections on investigations in the semi-arid region of NE Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 18, p. 127-150, 2009.
- ALENCAR, N. L. et al. The inclusion and selection of medicinal plants in traditional pharmacopoeias – evidence in support of the diversification hypothesis. **Economic Botany**, v. 64, n. 1, p. 68-79, 2010.
- ALONSO-CASTRO, A. J. et al. Medicinal plants used in the Huasteca Potosina, México. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 292-298, 2012.
- BLANCKAERT, I. et al. Ethnobotanical, morphological, phytochemical and molecular evidence for the incipient domestication of Epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.: Chenopodiaceae) in a semi-arid region of Mexico. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, p. 557-573, 2012.
- BORGES, A. R. et al. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 132, p. 123-128, 2012.
- CHABARIBERI, R. A. O. et al. Determinação espectrométrica dos 66lavonoides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 860-864, 2008.
- CORREA-ROYERO, J. et al. In vitro antifungal activity and citotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus 66lavonoid*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 734-741, 2010.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA**. 5. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2010.
- FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 369-394, 2006.
- FRANÇA, F.; LAGO, E. L.; MARSDEN, P. D. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (viannia) braziliensis* in the endemic area of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, p. 229-232, 1996.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GUPTA, G. S.; BEHARI, M. Chemical investigation of *Chenopodium ambrosioides*. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 49, n. 3, p. 317-319, 1972.
- HALLALA, A. et al. Evaluation of the analgesic and antipyretic activities of *Chenopodium ambrosioides* L. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**, v. 1, n. 4, p. 894-897, 2010.

HARBONE, J. B. **Phytochemical methods**. 3. Ed. London: Chapman & Hall, 1998.

HASEEB, A. et al. Evaluation of nematicidal property in certain alkaloid bearing plants. **Geobios**, v. 5, p. 116-118, 1978.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoides. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HEGAZY, A. K.; FARRAG, H. K. Allelopathic potential of *Chenopodium ambrosioides* on germination and seedling growth of some cultivated and weed plants. **Global Journal Biotechnology & Biochemistry**, v. 2, n. 1, p. 01-09, 2007.

JARAMILLO, B. E.; DUARTE, E.; DELGADO, W. Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 17, n. 1, p. 54-64, 2012.

JARDIM, C. M. et al. Composition and antifungal activity of the essential oil of the flavonoid *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, n. 9, p. 1213-1218, 2008.

JORGE, L. I. F.; FERRO, V. O.; KOSCHTSCHAK, M. R. W. Diagnose comparativa das espécies *Chenopodium ambrosioides* L. (erva-de-santa-maria) e *Coronopus didymus* (L.) Sm (mastruço) principais características morfo-histológicas e químicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, n. 2, p. 143-153, 1986.

KISMANN, K. G. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira, 1991. 608p.

KLIKS, M. M. Studies on the traditional herbal anthelmintic *Chenopodium ambrosioides* L.: ethnopharmacological evaluation and clinical field trials. **Social Science & Medicine**, v. 21, n. 8, p. 879-886, 1985.

KOMAROVA, N. I. et al. Quantitative HPLC determination of main flavonoid content of *Rhododendron adamsii* leaves and stems. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 1, p. 26-29, 2009.

KUMAR, R. et al. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 159-164, 2007.

LUZIATELLI, G. et al. Asháninka medicinal plants: a case study from the native community of Bajo Quimiriki, Junín, Peru. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 6, n. 21, 2010.

METZ, H. Thin-layer chromatography for rapid assays of enzymic steroid transformations. **Naturwissenschaften**, v. 48, n. 17, p. 569-70, 1961.

MORAIS, S. M. et al. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 169-177, 2005.

NEU, R. A new reagent for differentiating and determining flavones of paper chromatograms. **Naturwissenschaften**, v. 43, p. 82, 1956.

OKHALE, S. E. et al. Phytochemical and proximate analyses and thin layer chromatography fingerprinting of the aerial part of *Chenopodium ambrosioides* Linn. (Chenopodiaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 12, p. 2289-2294, 2012.

PETRY, R. D. et al. Doseamento do teor de flavonoides totais em extratos em extratos hidroalcóolicos de *Passiflora alata* Cryander (maracujá). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 79, n. 1/2, p. 7-10, 1998.

PETRY, R. D.; ORTEGA, G. G.; SILVA, W. B. Flavonoid content assay: influence of the reagent concentration and reaction time on the spectrophotometric 68lavonoi of the aluminium chloride – flavonoid complex. **Die Pharmazie**, v. 56, n. 6, p. 465-470, 2001.

RANDAU, K. P. et al. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p. 89-96, 2004.

ROBERTS, E. A. H.; CARTWRIGHT, R. A.; OLDSCHOOL, M. Phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 8, p. 72-80, 1957.

SANTAYANA, M. P.; BLANCO, E.; MORALES, R. Plants known as té in Spain: An ethno-pharmaco-botanical review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 1-19, 2005.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. 68l. Rev. Ampl., Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2004.

SOARES, L. A. L. et al. Total flavonoid determination for the quality control of aqueous extractives from *Phyllanthus niruri* L. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 22, n. 3, p. 203-207, 2003.

SOUZA, R. F. V.; GIOVANI, W. F. Synthesis, spectral and electrochemical properties of Al(III) and Zn(II) complexes with 68lavonoides. **Spectrochimica Acta, Part A**, v. 61, p. 1985–1990, 2005.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso, Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 135-142, 2006.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis – A thin layer chromatography atlas**. 2. Ed. Berlim: Springer-Verlag, 1996.

XAVIER, H. S. *Lavandula stoechas* L. (Lamiaceae): etude botanique, chimique et pharmacodynamique. 1988. Tese (Doutorado) – Université de Montpellier – I, Montpellier.

5 Capítulo III

5.1 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Chenopodium ambrosioides* L. POR CG-EM

5.1.1 Artigo 2 – Composição química do óleo essencial das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivadas em Recife-PE, Brasil

Artigo a ser submetido à *Flavour and Fragrance Journal*

Rafaela Damasceno Sá,^a M. A. M. Galvão,^a M. R. A. Ferreira,^a L. A. L. Soares,^a K. P. Randau^{a*}

^a Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-521, Recife-PE, Brasil. *karina.prandau@ufpe.br

RESUMO: *Chenopodium ambrosioides* L. é uma erva aromática amplamente distribuída ao longo da América, África e também em países da Europa. No Brasil, a planta é popularmente conhecida como mastruz e tem sido utilizada pela população como anti-helmíntica e para tratamentos de gripe. O óleo essencial das folhas de *C. ambrosioides* é o componente mais usado na medicina popular. Com o objetivo de conhecer a sua composição química, o óleo essencial das folhas da espécie, cultivada em Recife-PE, Brasil, foi extraído por hidrodestilação e analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. O rendimento médio do óleo foi de $0,7\% \pm 0,0982$. Os componentes majoritários encontrados foram α -terpineno (42,14%), α -terpinenil-acetato (31,57%) e timol (7,90%). O perfil encontrado reforça os dados da literatura a respeito da diferença da composição do óleo essencial de *C. ambrosioides* nos diferentes países em que a planta é encontrada.

PALAVRAS-CHAVE: α -terpineno; ascaridol; Chenopodiaceae; *Chenopodium ambrosioides*; óleo essencial

Introdução

O gênero *Chenopodium*, da família Chenopodiaceae, inclui diversas espécies nativas da Ásia, Europa e América, utilizadas como alimento, condimento e/ou plantas medicinais.^[1,2] *Chenopodium ambrosioides* L. é uma erva popularmente conhecida como epazote, Mexican tea, American wormseed, paico, mastruz e erva-de-Santa-Maria.^[3,4] A espécie é nativa da América Central e do Sul, originária, provavelmente, do México. Tem crescimento espontâneo em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, sendo encontrada em todos os continentes.^[5] No Brasil é extensa a sua distribuição, com ocorrência em quase todo o território.^[6,7] Tem sido utilizada pela população como anti-helmíntica e para tratamentos de gripe.^[7,8]

O óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* também é utilizado como anti-helmíntico, principalmente contra ascaridíase.^[9] Adicionalmente, apresenta propriedades antioxidante, antifúngica, alelopática e inseticida.^[10-12] Diante do amplo uso medicinal e de seu potencial farmacológico, *C. ambrosioides* é uma das 71 espécies vegetais que despertam o interesse para a produção de fitoterápicos, estando presente na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS).^[13]

Estudos prévios relatam a composição do óleo essencial da planta em outros países, como na Colômbia^[12] e na Nigéria.^[14] Entretanto, ainda são poucos os estudos com a espécie cultivada no Brasil.

O objetivo deste trabalho foi analisar a composição do óleo essencial das folhas de *C. ambrosioides* através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, a partir de plantas cultivadas em Recife-PE, Brasil.

Materiais e Métodos

Material vegetal

O espécime foi coletado na horta do Laboratório de Fitoterapia, da empresa Pernambuco Participações e Investimentos S/A (PERPART), localizada na cidade de Recife, estado de Pernambuco, Brasil. A exsicata foi depositada no herbário UFP-Geraldo Mariz, da Universidade Federal de Pernambuco – Brasil, sob o número 69.718.

Extração do óleo essencial

O óleo essencial foi extraído a partir de 30 g de folhas frescas por hidrodestilação durante 2 h, em aparelho de Clevenger. Após resfriamento, o óleo foi recolhido, dessecado com sulfato de sódio anidro, o volume determinado e o rendimento calculado pela média de três repetições, com base na matéria seca.^[15] O óleo foi armazenado a 4°C até ser analisado.

Análise do óleo essencial

O óleo foi analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas (CG-EM), utilizando cromatógrafo-gás-líquido acoplado à espectrômetro de massas (GCMS-

QP2010S, Shimadzu), onde as condições de injeção no cromatógrafo foram: volume de injeção: 1 μ L; modo splitless; coluna capilar RTX-5 (30 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 1 μ m); gás de arraste: hélio; fluxo na coluna de 2,52 mL/min; programação da temperatura na coluna: 50° a 280°C (4°C/min); temperatura do injetor: 250°C. As condições de injeção no espectrômetro de massas foram: voltagem: 70 eV; temperaturas na câmara de íons, na interface e no detector foram todas mantidas em 260°C. Os compostos foram identificados através dos espectros de massas obtidos por CG-EM e comparação com o banco de dados da biblioteca Wiley 229.

Resultados e Discussão

Através da hidrodestilação, foi obtido um óleo essencial de cor amarela e cheiro característico, com rendimento médio de $0,7\% \pm 0,0982$. Foram identificados dez compostos (Tabela 1), a maioria sendo monoterpenos e monoterpenos oxigenados. Os componentes majoritários encontrados no óleo essencial foram α -terpineno (42,14%) e α -terpinenil-acetato (31,57%), seguidos por timol (7,90%) (Figura 1).

Tabela 1. Composição química do óleo essencial das folhas de *Chenopodium ambrosioides*

Composto	Tempo de retenção (min)	Área %
α -terpineno	18,704	42,14
ρ -cimeno	19,138	7,29
γ -terpineno	21,220	0,75
α -terpinenil-acetato	32,543	31,57
Ascaridol	33,490	0,87
Timol	35,262	7,90
Carvacrol	35,851	4,27
Isoascaridol	36,396	2,61
Óxido de limoneno	49,494	0,44
Fitol	55,281	2,16

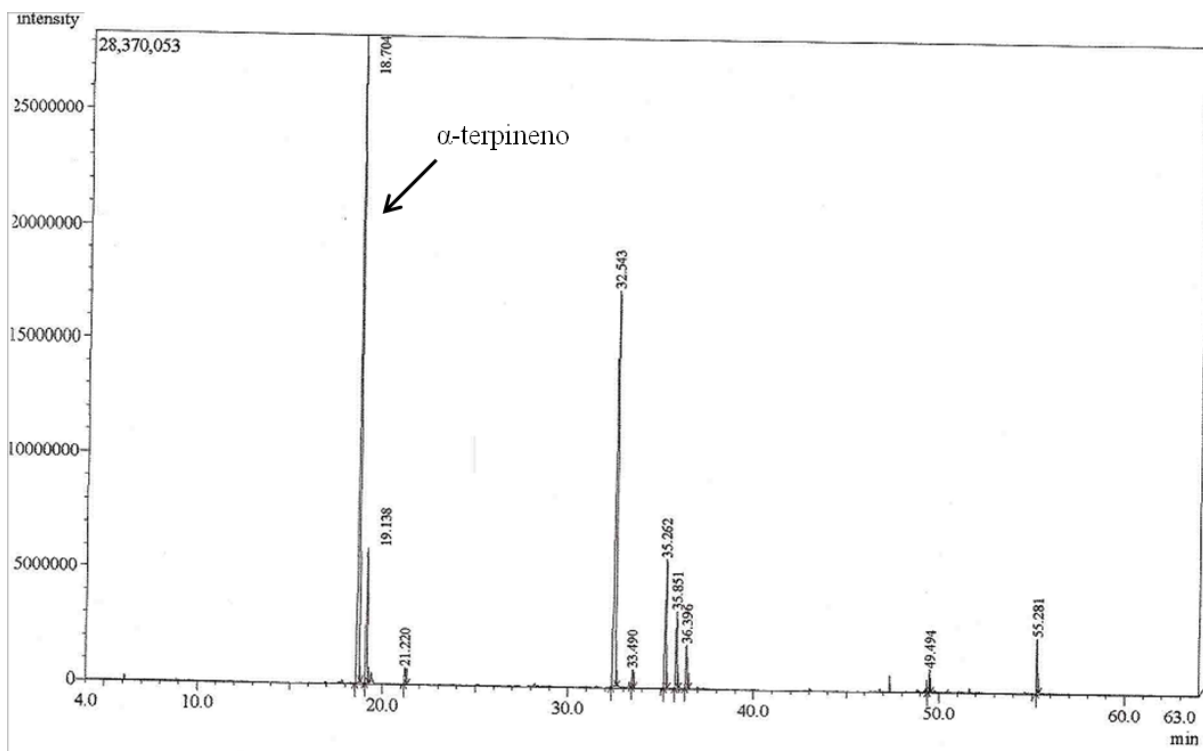


Figura 1. CG-EM do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides*

A composição do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* tem sido objeto de vários estudos e os dados da literatura mostram que ela não apresenta constância nem com relação aos compostos nem aos seus percentuais. Os fatores que determinam a composição e o rendimento dos óleos essenciais são numerosos e, em alguns casos, é difícil isolar estes fatores uns dos outros. Estas variáveis podem incluir a sazonalidade e maturidade da planta, a proveniência geográfica, a variação genética, os estágios de crescimento, a parte da planta utilizada e a secagem e o armazenamento pós-colheita.^[16]

No caso de *C. ambrosioides*, percebe-se a grande influência da proveniência geográfica da planta. O α -terpineno é o componente majoritário no óleo essencial da planta coletada na Nigéria,^[14,17,18] em Rwanda,^[19] na Colômbia,^[12] em Camarões^[20] e na Índia.^[21,22] Em contrapartida, na Índia também foi encontrado *m*-cimeno como majoritário, correspondendo a 43,90% do óleo.^[23] Em Camarões, Tapondjou et al.^[24] encontraram o *p*-cimeno correspondendo a 50% da constituição química do óleo essencial.

O conteúdo de ascaridol, componente para o qual são atribuídas algumas atividades biológicas do óleo,^[25,26] também é afetado pelo local de origem da planta. No Brasil, Jardim et al.^[25] reportaram um conteúdo de 80% de ascaridol no óleo da planta coletada na região Sudeste do país. No presente trabalho, com a espécie cultivada na região Nordeste, foi encontrado apenas 0,87%. Ascaridol também já foi encontrado como principal componente do

óleo essencial de *C. ambrosioides* de Madagascar,^[27] Togo,^[28] do Mediterrâneo Oriental^[29] e da China.^[26] Foi relatado, entretanto, em uma porcentagem mínima de 0,1% no óleo essencial de planta da Nigéria.^[17]

Johnson e Croteau^[30] mostraram que a biossíntese do ascaridol a partir do α -terpineno foi catalisada por uma peroxidase de iodeto solúvel, que foi isolada a partir de homogeneizados das frutas e folhas de *Chenopodium ambrosioides*. A síntese enzimática do ascaridol foi confirmada por CG/EM do produto. De acordo com Gobbo-Netto e Lopes^[31] os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente. Assim, os estímulos decorrentes do ambiente no qual a planta se encontra podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos, o que pode também explicar as variações na composição química do óleo de *C. ambrosioides*.

Por ser uma planta de grande interesse medicinal e, visto que as atividades biológicas estão relacionadas à presença dos metabólitos secundários, são necessários mais estudos sobre os fatores que afetam a composição do óleo essencial de *C. ambrosioides*. Os resultados seriam importantes para a obtenção de plantas com maior acúmulo dos compostos de interesse e também para a otimização das técnicas de colheita, pós-colheita e extração, em direção ao potencial de aplicação comercial da planta.^[32]

Conclusão

No presente estudo foi determinada a composição do óleo essencial das folhas de *C. ambrosioides* cultivadas em Recife-PE, Brasil. Foi visto também que o local de coleta da planta é um importante fator a ser considerado para a análise do óleo essencial da espécie.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq (132722/2011-9) pelo apoio financeiro na forma de subsídios e bolsa de estudo. Agradecemos também a PERPART pelo fornecimento do material vegetal.

Referências

1. Z. Kokanova-Nedialkova, P. T. Nedialkov, S. D. Nikolov, *Phcog. Rev.* **2010**, 3, 280.
2. I. Blanckaert, M. Paredes-Flores, F. J. Espinosa-García, D. Piñero, R. Lira, *Genet. Resouc. Crop. Evol.* **2012**, 59, 557.
3. M. M. Kliks, *Soc. Sci. Med.* **1985**, 21, 879.
4. U. P. Albuquerque, T. A. S. Araújo, M. A. Ramos, V. T. Nascimento, R. F. P. Lucena, J. M. Monteiro, N. L. Alencar, E. E. Araújo, *Biodivers. Conser.* **2009**, 18, 127.
5. K. G. Kismann, *Plantas infestantes e nocivas*, BASF Brasileira, São Paulo, **1991**.
6. M. P. Sousa, M. E. O. Matos, F. J. A. Matos, M. I. L. Machado, A. A. Craveiro, *Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras*, Editora UFC, Fortaleza, **2004**.
7. J. L. S. Lima, D. A. Furtado, J. P. G. Pereira, J. G. V. Baracuthy, H. S. Xavier, *Plantas medicinais de uso comum no Nordeste do Brasil*, Campina Grande, **2006**.
8. S. M. Moraes, J. D. P. Dantas, A. R. A. Silva, E. F. Magalhães, *Rev. Bras. Farmacogn.* **2005**, 15, 169.
9. D. L. Guimaraes, R. S. N. Llanos, J. H. R. Acevedo, *Rev. Gastroenterol. Perú.* **2001**, 21, 212.
10. A. K. Hegazy, H. K. Farrag, *Global J. Biotech. Biochem.* **2007**, 2, 01.
11. R. Kumar, A. K. Mishra, N. K. Dubey, Y. B. Tripathi, *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, 115, 159.
12. B. E. Jaramillo, E. Duarte, W. Delgado, *Rev. Cubana Plant. Med.* **2012**, 17, 54.
13. Plantas de interesse ao SUS.
http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30277&janela=1[accessed May 2012].
14. A. A. Gbolade, V. Tira-Picos, J. M. F. Nogueira, *Chem. Nat. Comp.* **2010**, 46, 654.
15. A. S. Santos, S. M. Alves, F. J. C. Figueiredo, O. G. Rocha Neto, *Comunicado Técnico-Embrapa* **2004**, 99, 1.
16. F. Anwar, *J. Herbs Spices & Med Plants.* **2009**, 15, 1.
17. P. A. Onocha, O. Ekundayo, T. Eramo, I. Laakso, *J. Essent. Oil Res.* **1999**, 11, 220.
18. A. A. Kasali, O. Ekundayo, C. Paul, W. A. König, A. O. Eshilokun, B. Ige, *J. Essent. Oil Res.* **2006**, 18, 13.
19. A. Muhayimana, J. C. Chalchat, R. P. Garry, *J. Essent. Oil Res.* **1998**, 10, 690.
20. M. S. G. Chekem, P. K. Lunga, J. D. D. Tamokou, J. R. Kuate, P. Tane, G. Vilarem, Muriel Cerny, *Pharmaceuticals* **2010**, 3, 2900.
21. D. Gupta, R. Charles, V. K. Mehta, S. N. Garg, S. Kumar, *J. Essent. Oil Res.* **2002**, 14, 93.
22. H. P. Singh, D. R. Batish, R. K. Kohli, S. Mittal, S. Yadav, *Chem. Nat. Comp.* **2008**, 44, 378.
23. C. S. Prasad, R. Shukla, A. Kumar, N. K. Dubey, *Mycoses* **2010**, 53, 123.
24. L. A. Tapondjou, C. Adler, H. Bouda, D. A. Fontem, *J. Stored Prod. Res.* **2002**, 38, 395.
25. C. M. Jardim, G. N. Jham, O. D. Dhingra, M. M. Freire, *J. Chem. Ecol.* **2008**, 34, 1213.
26. S. S. Chu, J. F. Hu, Z. L. Liu, *Pest. Manag. Sci.* **2011**, 67, 714.
27. J. Cavalli, F. Tomi, A. Bernardini, J. Casanova, *Phytochem. Anal.* **2004**, 15, 275.
28. K. Koba, G. Catherine, C. Raynaud, J. Chaumont, K. Sanda, N. Laurence, *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* **2009**, 44, 435.

29. V. Dembitsky, I. Shkrob, L. O. Hanus, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* **2008**, 152, 209.
30. M. A. Johnson, R. Croteau, *Arch. Biochem. Biophys.* **1984**, 235, 254.
31. L. Gobbo-Neto, N. P. Lopes, *Quím. Nova* **2007**, 30, 374.
32. C. J. Silva, L. C. A. Barbosa, A. J. Demuner, R. M. Montanari, D. Francino, R. M. S. A. Meira, A. O. Souza, *Rev. Bras. Farmacogn.* **2012**, 22, 482.

6 Capítulo IV

6.1 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA O ÓLEO ESSENCIAL DE *Chenopodium ambrosioides* L.

6.1.1 Artigo 3 – Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a quantificação dos constituintes do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L. por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama

Artigo a ser submetido à Química Nova

**Rafaela Damasceno Sá, Marcos Aurélio Moraes Galvão, Magda Rhayanny Assunção
Ferreira, Luiz Alberto Lira Soares, Karina Perrelli Randau***

Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Arthur de Sá, s/n, Cidade Universitária, 50740-521, Recife-PE, Brasil.

*karina.prandau@ufpe.br

RESUMO

A necessidade de se mostrar a qualidade das análises químicas está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que o método analítico é apropriado para a finalidade pretendida, se faz necessário realizar a validação da metodologia. Baseando-se neste fato, o presente estudo visou validar uma metodologia analítica para quantificar os constituintes do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L. através de cromatografia gasosa com detector de ionização em chama. Todos os parâmetros exigidos pela ANVISA foram avaliados. O método proposto mostrou-se linear, com alta sensibilidade de quantificação, além de ser considerado específico, preciso, exato e robusto.

Palavras-chave: *Chenopodium ambrosioides* L.; cromatografia gasosa; validação de metodologia.

INTRODUÇÃO

O gênero *Chenopodium*, pertencente à família Chenopodiaceae, inclui diversas espécies nativas da Ásia, Europa e América.¹ *Chenopodium ambrosioides* L. é uma erva nativa da América Central e do Sul, originária, provavelmente, do México.² Ocorre em quase todo o território do Brasil,^{3,4} onde é popularmente conhecida como mastruz.⁵ As folhas e o óleo essencial da espécie são muito utilizados para tratamentos de vermes e de gripe.^{6,7}

Várias atividades biológicas têm sido reportadas para o óleo essencial de *C. ambrosioides*, tais como anti-helmíntica,⁸ antioxidante,⁹ antifúngica,¹⁰ antiparasitária¹¹ e inseticida.¹²

O óleo essencial da espécie é conhecido por conter principalmente monoterpenos em sua composição e alguns estudos atribuem a atividade do óleo à presença desses compostos.^{12,13}

Devido ao seu amplo uso popular e ao seu interesse medicinal, *C. ambrosioides* encontra-se na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS). Esta relação foi divulgada pelo Governo Federal Brasileiro em 2009 e tem o objetivo de incentivar e direcionar pesquisas científicas para plantas que possuam potencial para se tornarem fitomedicamentos.¹⁴

Uma etapa imprescindível no desenvolvimento de fitoterápicos consiste na utilização de métodos analíticos que permitem a avaliação da qualidade do fitoterápico, promovem a garantia da constância da ação terapêutica e a segurança de sua utilização.¹⁵ Esses métodos compreendem requisitos indispensáveis ao registro desses produtos no Brasil.¹⁶

Entretanto, antes de sua adoção oficial, é preciso demonstrar que o método é apropriado para sua finalidade, através de uma série de estudos experimentais denominado validação.¹⁷ De acordo com a Resolução Específica (RE) nº 899/03 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no processo de validação de uma metodologia analítica é necessário avaliar alguns parâmetros: especificidade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez.¹⁸

Levando em consideração a importância do óleo essencial de *C. ambrosioides* para o desenvolvimento de novos produtos naturais e do seu amplo interesse popular e institucional, o objetivo desse estudo é desenvolver e validar uma metodologia analítica para quantificação dos constituintes do óleo essencial de *C. ambrosioides*, através da cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG-DIC), de forma que o mesmo atenda às exigências sanitárias em vigor.¹⁸

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes

O solvente utilizado nas análises foi de grau analítico (diclorometano P.A. - Cinética). O padrão de timol foi adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich), apresentando pureza maior que 99,5%.

Material vegetal

A planta foi coletada na horta do Laboratório de Fitoterapia, da empresa Pernambuco Participações e Investimentos S/A (PERPART), localizada na cidade de Recife, estado de Pernambuco, Brasil. A exsicata foi depositada no herbário UFP-Geraldo Mariz, da Universidade Federal de Pernambuco - Brasil, sob o número 69.718.

Extração do óleo essencial

O óleo essencial foi extraído a partir de 30 g de folhas frescas por hidrodestilação durante 2 h, em aparelho de Clevenger. Após resfriamento, o óleo foi recolhido, dessecado com sulfato de sódio anidro e armazenado a 4°C até ser analisado. Para ser injetado no CG, o óleo essencial foi diluído em 20 µL de diclorometano.

Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás (GC-17A, Shimadzu), equipado com detector de ionização em chama, injetor tipo split com divisão de vazão de 1:50 e utilizando uma coluna capilar SPBTM-5 (Supelco) (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). As temperaturas do injetor e do detector foram de 270°C e 290°C, respectivamente, e a programação da temperatura do forno foi de isoterma inicial de 5 minutos a 60°C, seguida por taxa de aumento de 2°C/min até 80°C, depois taxa de aumento de 10°C/min até 200°C e logo após 20°C/min até 280°C, mantidos por 2 min. Hélio foi utilizado como gás de arraste na vazão de 1,70 mL/min. O volume de injeção foi de 1 µL.

Validação do método analítico

O método desenvolvido foi avaliado quanto à especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez, de acordo com as normas estabelecidas.¹⁸

Especificidade

Injetaram-se o solvente, uma solução contendo 120 µg/mL de timol em diclorometano e uma amostra do óleo, com o objetivo de se verificar a pureza dos picos. Determinaram-se as medidas de separação das substâncias da amostra: fator de separação α , resolução e número de pratos teóricos. Segundo o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO)¹⁹ esses parâmetros calculados nos cromatogramas descrevem a especificidade do método.

Linearidade

A linearidade foi verificada a partir da análise de três curvas autênticas, construídas com o padrão de timol, em cinco níveis de concentração, na faixa de 40 a 200 µg/mL. As curvas foram construídas empregando-se os valores médios das áreas dos sinais do padrão em função da concentração. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente através do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, a fim de definir o coeficiente de determinação (R^2) e de obter a equação da reta do timol.

Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados (em µg/mL) de acordo com as equações $LD = DP_a \times 3/IC$ e $LQ = DP_a \times 10/IC$, onde DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y, obtido das três curvas de linearidade e IC é a média dos coeficientes angulares (inclinação da reta) das respectivas curvas.

Precisão

A precisão foi determinada em dois níveis:

- a. Repetibilidade (precisão intracorrída): foram examinadas, em um único dia, seis determinações para amostras a 100% da concentração teste.
- b. Precisão intermediária (intercorridas): determinada por dois analistas em dois dias consecutivos, para amostras também na concentração de 100%.

Exatidão

A exatidão foi avaliada por ensaios de recuperação, através da adição de quantidades conhecidas do padrão a amostras a 100% da concentração teste. Os valores de recuperação, expressos em porcentagem, foram determinados através da razão entre as concentrações médias determinadas experimentalmente com as concentrações teóricas correspondentes.

Robustez

Os fatores a serem considerados para analisar a robustez foram: temperatura do detector (288°C e 292°C), vazão do gás de arraste (1,68 mL/min e 1,72 mL/min) e temperatura inicial da coluna (58°C e 62°C).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Especificidade

A especificidade foi determinada através da constatação visual da separação do pico do timol nos cromatogramas. Com a injeção do padrão de timol, verificou-se o tempo de retenção deste no método desenvolvido, que foi de 21,91 min (Figura 1). Em seguida, injetando-se a amostra do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* (Figura 2), foi possível verificar a presença do analito de interesse e sua separação cromatográfica dos demais picos da amostra, bem como calcular o fator de separação α , a resolução e o número de pratos teóricos, que foram, respectivamente 1,04, 6,46 e 329052. O valor aceitável²⁰ para a resolução deve ser >2 e para o número de pratos teóricos 2000. Verifica-se, assim, que o método foi capaz de selecionar o composto de interesse.

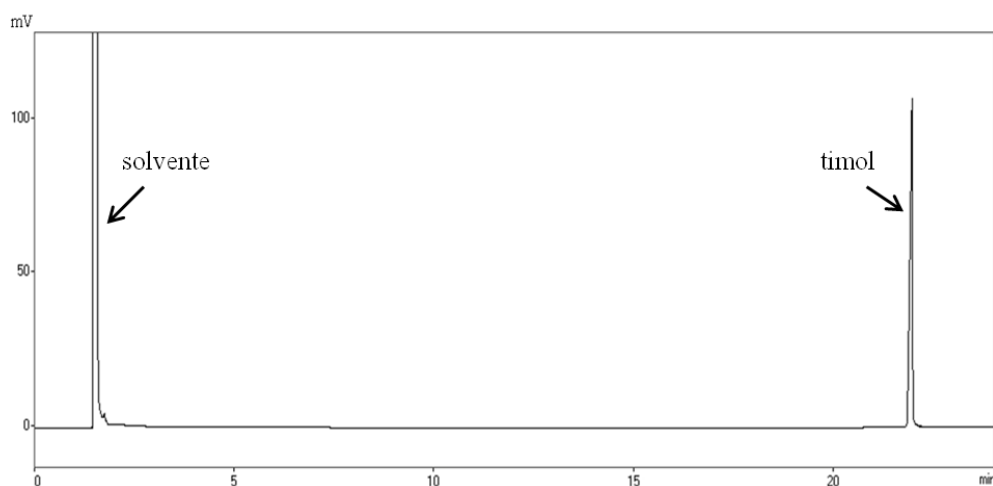


Figura 1. Cromatograma do padrão de timol

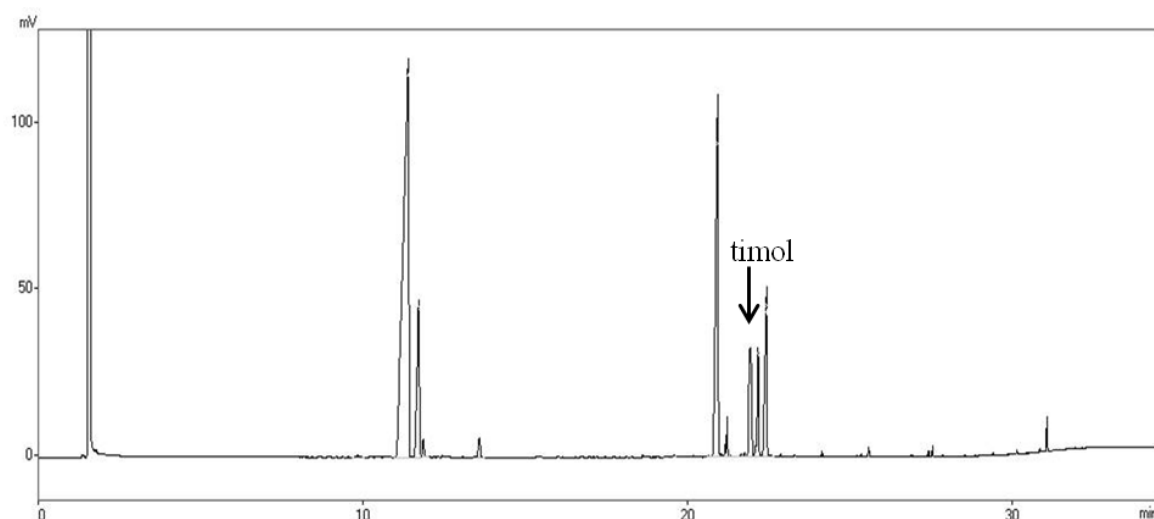


Figura 2. Cromatograma do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides*

Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

Os resultados dos pontos das três curvas das soluções padrão foram plotados na Figura 3. A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação.¹⁸ Então, de acordo com os dados apresentados, o método apresentou linearidade dentro da faixa de concentrações estudadas para o padrão. A equação da regressão linear média, obtida a partir de três curvas de calibração, foi $y = 2315x + 3431,7$, onde y é a área do sinal do padrão e x a concentração ($\mu\text{g/mL}$) do padrão.

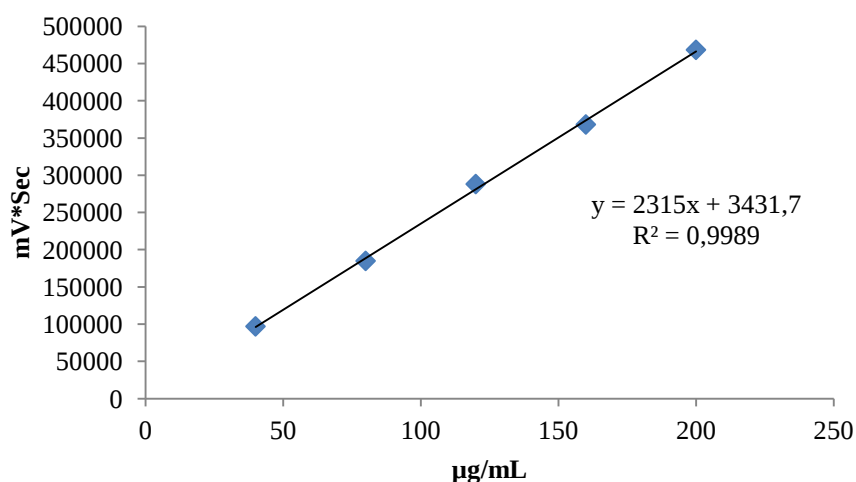


Figura 3. Curva de calibração construída com padrão de timol (40-200 µg/mL)

O coeficiente de determinação é frequentemente usado para indicar a adequabilidade da curva como modelo matemático.¹⁹ A ANVISA¹⁸ recomenda um coeficiente de determinação igual a 0,99 e o INMETRO¹⁹ recomenda um valor acima de 0,90. O coeficiente de determinação obtido foi $R^2=0,9989$, comprovando a adequação do método ao intervalo avaliado e estando dentro dos requisitos mínimos exigidos pelas agências reguladoras.

Considerando os limites de detecção e de quantificação, os resultados encontrados foram de 0,3322 µg/mL e 1,1074 µg/mL. Com esses resultados, verifica-se que o método possui alta sensibilidade para detectar e quantificar o padrão de timol no óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides*.

Precisão e exatidão

O método mostrou-se preciso nos dois níveis analisados. Quanto ao parâmetro repetibilidade, o resultado apresentou uma concentração média de timol de 6,94 g% e um desvio padrão relativo (DPR%) de 0,41%. Quanto ao parâmetro precisão intermediária, foi demonstrado através do tratamento estatístico por ANOVA *Two-Way*, que o método é preciso para as análises realizadas por analistas diferentes em um mesmo dia e em dias diferentes, em virtude dos F calculados terem sido inferiores aos F tabelados (Tabela 1).

Tabela 1. Análise de variância obtida a partir dos resultados da precisão intermediária

ANOVA	SQ	MQ	F _{calculado}	F _{crítico}
Fonte de variação				
Entre grupos	0,0556	0,0111	2,1186	2,9013
Dentro dos grupos	0,0138	0,0046	0,8751	3,2874
Total	0,1481			

A exatidão do método, calculada pelo ensaio de recuperação, foi averiguada através da análise de três concentrações distintas, encontrando-se resultados entre 96,82 e 97,49% (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados obtidos no teste de recuperação

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração real (µg/mL)	Recuperação (%) ± dp	DPR%
87	84,704	96,82 ± 0,22	0,26
132	128,604	97,37 ± 0,05	0,04
167	162,453	97,49 ± 0,21	0,13

dp = desvio padrão; DPR% = desvio padrão relativo.

A ANVISA regulamenta que os resultados da precisão não podem ultrapassar 5% e, para exatidão, não deve ser inferior a 95%.¹⁸ Estes dados confirmam que o método de quantificação proposto encontra-se em conformidade com a legislação vigente e apresenta confiabilidade dos resultados.

Robustez

Os fatores da robustez foram avaliados através de tratamento estatístico ANOVA *One-Way*, e os resultados dessa análise se encontram na Tabela 3. O método mostrou-se robusto em todos os fatores analisados, visto que os valores encontrados de F calculados foram menores aos F tabelados.

Tabela 3. Análise de variância obtida a partir dos resultados da robustez

Parâmetro	°C	Média ± dp	F
Temperatura do detector	288	21593,00 ± 88	F _{calculado} = 2,268706
	290	21596,33 ± 94	F _{crítico} = 5,143253
	292	21707,00 ± 14	
Vazão do gás de arraste	mL/min	Média ± dp	
	1,68	21567,00 ± 125	F _{calculado} = 0,974123
	1,70	21596,33 ± 94	F _{crítico} = 5,143253
	1,72	21670,67 ± 45	
Temperatura inicial da coluna	°C	Média ± dp	
	58	21616,67 ± 74	F _{calculado} = 0,487836
	60	21596,33 ± 94	F _{crítico} = 5,143253
	62	21362,00 ± 596	

dp = desvio padrão

CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos na validação, verifica-se que o método desenvolvido apresentou seletividade, exatidão e precisão excelentes, parâmetros que refletem a qualidade e a segurança da quantificação do composto de interesse, atestando confiabilidade necessária para o emprego desta metodologia no controle de qualidade. Adicionalmente, o método mostrou-se linear, robusto e possui alta sensibilidade de quantificação, aliado à acessibilidade e fácil execução. Apresenta, portanto, adequação a todos os parâmetros de validação estabelecidos pela RE nº 899/03 da ANVISA.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (132722/2011-9) pelo apoio financeiro na forma de subsídios e bolsa de estudo. Agradecemos também a PERPART pelo fornecimento do material vegetal.

REFERÊNCIAS

1. Kokanova-Nedialkova, K.; Nedialkov, P. T.; Nikolov, S. D.; *Phcog. Rev.* **2010**, 3, 280.
2. Kismann, K. G.; *Plantas infestantes e nocivas*, BASF Brasileira: São Paulo, 1991.
3. Sousa, M. P.; Matos, M. E. O.; Matos, F. J. A.; Machado, M. I. L.; Craveiro, A. A.; *Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras*, Editora UFC: Fortaleza, 2004.
4. Lima, J. L. S.; Furtado, D. A.; Pereira, J. P. G.; Baracuthy, J. G. V.; Xavier, H. S.; *Plantas medicinais de uso comum no Nordeste do Brasil*, Campina Grande, 2006.
5. Albuquerque, U. P.; Araújo, T. A. S.; Ramos, M. A.; Nascimento, V. T.; Lucena, R. F. P.; Monteiro, J. M.; Alencar, N. L.; Araújo, E. E.; *Biodivers. Conser.* **2009**, 18, 127.
6. Morais, S. M.; Dantas, J. D. P.; Silva, A. R. A.; Magalhães, E. F.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2005**, 5, 169.
7. Almeida, C. F. C. B. R.; Ramos, M. A.; Amorim, E. L. C.; Albuquerque, U. P.; *J. Ethnopharmacol.* **2010**, 127, 674.
8. Guimaraes, D. L.; Llanos, R. S. N.; Acevedo, J. H.R.; *Rev. Gastroenterol. Perú.* **2001**, 21, 212.
9. Kumar, R.; Mishra, A. K.; Dubey, N. K.; Tripathi, Y. B.; *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, 115, 159.
10. Jardim, C. M.; Jham, G. N.; Dhingra, O. D.; Freire, M. M.; *J. Chem. Ecol.* **2008**, 34, 1213.
11. Monzote, L.; Montalvo, A. M.; Scull, R.; Miranda, M.; Abreu, J.; *Biomed. Pharmacother.* **2007**, 61, 148.
12. Jaramillo, B. E.; Duarte, E.; Delgado, W.; *Rev. Cubana Plant. Med.* **2012**, 17, 54.
13. Gupta, D.; Charles, R.; Mehta, V. K.; Garg, S. N.; Kumar, S.; *J. Essent. Oil Res.* **2002**, 14, 93.
14. http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30277&janela=1, acessada em Maio 2012.
15. Toledo, A. C. O.; Hirata, L. L.; Buffon, M. C. M.; Miguel, M. D.; Miguel, O. G.; *Rev. Lecta* **2003**, 21, 7.
16. Brasil; Resolução RDC nº14 de 31/03/10; *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 05/04/10, seção 1 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.
17. Randau, K. P.; Meira, J. L.; Farias Braga, J. M.; Monteiro, D. B.; Rolim Neto, P. J.; *Acta Farm. Bonaerense* **2005**, 24, 104.
18. Brasil; Resolução RE nº899 de 29/5/2003; *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 02/06/2003, seção 1 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprova Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.
19. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. DOC-CGCRE-008. 2003.
20. *The United States Pharmacopeia*, 33^a. ed., United States Pharmacopoeial Convention: Rockville, 2010.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

A revisão da literatura permitiu concluir que o amplo emprego da espécie *Chenopodium ambrosioides* L. encontra respaldo em vários estudos científicos. Porém, mais estudos ainda podem ser efetuados para avaliar outras atividades farmacológicas, estabelecer os compostos responsáveis por tais atividades e seus mecanismos de ação.

Por meio da análise anatômica, observou-se que as diferentes partes de *C. ambrosioides* possuem características anatômicas semelhantes às encontradas em outras espécies da família Chenopodiaceae. Mas também, possuem características próprias que permitem a sua correta identificação.

A prospecção fitoquímica permitiu observar que as folhas de *C. ambrosioides* apresentam diferentes classes de metabólitos secundários. A presença de alguns metabólitos, como terpenos e flavonoides, os quais têm sido reportados por exibirem atividades biológicas no homem, sugere que a planta pode ser utilizada como uma potente droga vegetal.

Além de identificar a presença de flavonoides, foi possível determinar o seu teor, através da espectrofotometria no UV-Vis, que é uma técnica comumente empregada para quantificar flavonoides em materiais vegetais.

Com a análise do óleo essencial por CG-EM e a comparação com os dados da literatura, fica demonstrada a variabilidade na composição química do óleo essencial de *C. ambrosioides*, levando a concluir que o local de coleta da planta é um importante fator que deve ser levado em consideração para a sua análise.

A metodologia desenvolvida para quantificar os constituintes do óleo essencial de *C. ambrosioides* foi validada de acordo com parâmetros estabelecidos pela RE nº 899/03 da ANVISA, estando disponível como uma técnica específica, sensível, precisa, exata e robusta, sendo apta para a rotina laboratorial.

Os resultados deste trabalho contribuem para um melhor conhecimento de *C. ambrosioides* e para o estabelecimento de parâmetros de qualidade para a espécie.

Referências

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U. P. et al. How ethnobotany can aid biodiversity conservation: reflections on investigations in the semi-arid region of NE Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 18, p. 127-150, 2009.
- ALMEIDA, N. F. L. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais na cidade de Viçosa - MG. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 4, p. 316-320, 2009.
- ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 03, p. 10-15, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da saúde, 2009a. 136p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Plantas de interesse ao SUS**. 2009b. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30277&janela=1>. Acesso em: 15 maio 2012.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.
- GUIMARAES, D. L.; LLANOS, R. S. N.; ACEVEDO, J. H.R. Ascaridiosis: comparison of the therapeutic efficacy between paico and albendazole in children from Huaraz. **Revista de Gastroenterología del Perú**, v. 21, n.3, p. 212-219, 2001.
- HALLALA, A. et al. Evaluation of the analgesic and antipyretic activities of *Chenopodium ambrosioides* L. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**, v. 1, n. 4, p. 894-897, 2010.
- JARDIM, C. M. **Composição e atividade antifúngica de extratos de *Chenopodium ambrosioides* L.** 2006. 83p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- LIMA, J. L. S. et al. **Plantas medicinais de uso comum no Nordeste do Brasil**. Campina Grande, 2006, 81p.
- MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 03, p. 429-438, 2002.
- MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 01, p. 105-111, 2001.
- MONZOTE, L. et al. Activity, toxicity and analysis of resistance of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* after intraperitoneal, oral and intralesional administration in

BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*: A preliminary study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, n. 2-3, p. 148-153, 2007.

MORAIS, S. M. et al. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 169-177, 2005.

NASCIMENTO, F. R. F. et al. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. **Life Sciences**, v. 78, p. 2650-2653, 2006.

PHARMACOPOEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. São Paulo: Nacional, 1. ed., 1926.

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

SANTOS, R. L. et al. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 04, p. 486-491, 2011.

SOUSA, M. P. et al. **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: Editora UFC, 2004.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fármacos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 02, p. 289-306, 2006.

VEIGA Jr, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 03, p. 519-528, 2005.

ANEXO

ANEXO A – Orientações para a publicação de artigos na Revista Brasileira de Farmacognosia

The **Revista Brasileira de Farmacognosia** (*Brazilian Journal of Pharmacognosy*) is a periodical dedicated to the publication of original scientific work, reviews and communications in the field of Pharmacognosy (the study of biologically active natural products).

1. Rules for the elaboration of contributions

1.1 The author(s) should retain a copy (electronic and paper) of the submitted manuscript in the event of loss or damage to the original sent to the journal.

1.2 Figures (photographs, charts, drawings, *etc.*) and tables should be inserted close to the point at which they are discussed and numbered consecutively in Arabic numerals. The respective captions should be clear, concise, with no abbreviations and located underneath the figures. Their respective position in the text should be indicated preferentially just after their citation in the body of the manuscript. *If figures are from another font, formal authorization is required.*

1.3 Tables should be numbered consecutively using Arabic numerals. Tables (numerical data) should not be closed by side lines. The respective captions must be clear, concise, with no abbreviations and located above the table. There should be an indication of the approximate position in the text where tables should be placed (preferentially just after their citation in the body of the manuscript).

1.4 The captions of botanical illustrations (abbreviations of anatomical descriptions) should be in accordance with the rules adopted by the journal. Please request standards by email to revista@sbfgnosia.org.br.

2. Text formatting and contents of the work

2.1 Original papers: Original papers are research articles describing original experimental results. The manuscript should be arranged in the following order: Title, Abstract, Keywords, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Figures with Legends, Tables and Structural Formulae. Results and Discussion sections may appear as a combined 'Results and Discussion' section. The normal length of the main text of an Original Paper (excluding references, tables, figures and figure legends) is approximately 3,000 words. Longer manuscripts may be accepted in exceptional and well-justified cases. If

submitting such manuscripts, authors should provide a justification statement in the covering letter, giving compelling reasons for the length of the paper.

2.2 Short communications: This section will cover mainly the isolation of known compounds from new neotropical sources, or complementary results of on-going work. The text should be arranged as follows: Title, Abstract of 200 words, Keywords, Introductory Remarks, Material and Methods with brief experimental details without subheadings, Results and Discussion as one body of text without headlines, Acknowledgements, References (up to 20 citations) and Figures and/or Tables (up to 3). The text should not exceed 2,000 words.

2.3 Reviews will, in general, be invited by the Editor-in-Chief and only those with more than 100 references will be considered. The main purpose of reviews is to provide a concise, accurate introduction to the subject matter and inform the reader critically of the latest developments in the field. They should be concise and not include experimental details.

2.4. In addition to these Guidelines, a template (for original papers) and a sample covering letter are available at www.sbfgnosia.org.br/revista. Authors are strongly recommended to follow these formats when preparing a manuscript.

2.5 The originals should be on A4-sized paper, double-spaced using Times New Roman size 12 font, fully justified, with margins of 2 cm.

2.6 Title and subtitle: They should be in lower case, using Times New Roman size-14 font, and in accordance with the contents of the article, taking in consideration the scope and objectives of the journal.

2.7 Authors: The authors' names should appear centred underneath the title. The first and last names should appear in full, followed by the initials of all other names (*e.g.* Carlos N. U. Silva). In the case of several authors, the names should be separated by commas.

2.8 Author affiliations: After each author name there should be superscript Arabic numerals indicating the institution to which they are affiliated. The list of institutions should appear immediately below the list of authors. The name of the corresponding author should be identified with a superscript asterisk indicating the address to which all correspondence should be sent. The electronic institutional address, telephone number and fax number of the main author should appear after the References. The journal will not publish commercial e-mail addresses.

2.9 Abstract: A brief and concise abstract of ≤ 200 words highlighting the most important information (including the methodology, results and conclusions) that allows readers to evaluate their interest in the article and thus avoiding reading of the entire work.

2.10 Keywords: Very important for database searches, thus validating the article. The authors should identify a maximum of six Keywords, in alphabetical order and separated by commas, to represent the content of the article.

2.11 Introduction: The Introduction should clearly establish the objectives of the work and its relationship with other works in the same field. Extensive literature reviews should be replaced by references of more recent publications, where these reviews have been published and where they are available.

2.12 Materials and methods: The description of the Material and the Methods used should be brief and sufficiently clear for comprehension and reproducibility of the work. Processes and techniques already published, unless extensively modified, should be referenced. Plant names should be complete, including author name and family, according to <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/>; www.theplantlist.org/ or www.tropicos.org.

2.13 Results: The Results should be presented with minimum personal discussion or interpretation, and whenever possible, be accompanied by suitable tables and figures. The data, if pertinent, should be subjected to statistical analyses.

2.14 Discussion: The Discussion must be restricted to the significance of the data presented, avoiding conclusions not based upon them. Alternatively, at the discretion of the author, the Results and Discussion can be presented as one section.

2.15 Acknowledgements: This is an optional item. Please acknowledge anyone who made a substantial contribution towards the article.

2.16 Author contributions: The role of each author involved in the development of the study and/or the elaboration of the manuscript must be clearly described, and he/she should be referred to by his/her initials. Please see the template for examples.

3. References

The formatting of the references should be standardised to conform to the requirements of the journal as outlined. *Preferentially use references that can be accessed by the readers worldwide.*

3.1 References within the text: at the beginning of the citation: Author in lower case, followed by the publication year between parenthesis, *e.g.* Pereira (1999); at the end of the citation: Author in lower1999) or (Silva & Souza, 1998) or (Silva et al., 1999) or (Silva et al., 1995a,b); textual citation: the page must be provided, *e.g.* (Silva, 1999, p. 24).

3.2 The references should be presented in alphabetical order by the last name of the first author, in lower case in ascending order of the publication date. Take into consideration the following possibilities:

3.2.1 Article from a periodical: Title of the periodical in italics abbreviated conform *Chemical Abstracts Service Source Index* (<http://www.cas.org/sent.html> or <http://library.caltech.edu/reference/abbreviations/>). In the case of an authorised abbreviation of a certain periodical that cannot be located and is not obvious, the title should be cited complete (e.g.): Kumar D, Bhujbal SS, Deoda RS, Mudgade SC 2010. *In-vitro* and *in-vivo* antiasthmatic studies of *Ailanthus excelsa* Roxb. on guinea pigs. *J Sci Res* 2: 196-202.

In case the cited journal is not readily accessible, the *Chemical Abstract Number* can be quoted, as follows: Qu W, Li J, Wang M 1991. Chemical studies on *Helicteres isora* L. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao* 22: 203-206, apud *Chemical Abstracts* 116: 124855r.

In a citation, the sources should be shown in italics: Wax ET 1977. Antimicrobial activity of Brazilian medicinal plants. *J Braz Biol Res* 41: 77-82, apud *Nat Prod Abs* 23: 588-593, 1978.

3.2.2 Book:

Costa AF 1996. *Farmacognosia*. Lisboa: Calouste Gulbenkian.

3.2.3 Book chapter:

El Sohly MA, Stanford DS, Murphy TP 2007. Compounds properties and drug quality. In El Sohly MA (org.) *Forensic Science and Medicine: Marijuana and the Cannabinoids*. New Jersey: Humana Press, p. 51-66.

3.2.4 Thesis or dissertation materials:

Singab ANBI 1996. *Phytochemical studies of some potential bioactive Egyptian plants*. Tokyo, 173p. PhD Thesis, Meiji College of Pharmacy.

Romero MAV 1997. *Estudo químico de Brunfelsia hopeana Benth e do mecanismo de ação da escopoletina*. João Pessoa, 119p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais, Universidade Federal da Paraíba.

3.2.5 Scientific meetings:

Oliveira RMMW, Lolli LF, Santos CAM 2006. Possible involvement of GABAA-benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice. 19th ECNP Congress. Paris, France.

3.2.6 Patents: Should be identified as indicated below; whenever possible the Chemical Abstracts Service number should be informed.

Ichikawa M, Ogura M, Lijima T 1986. Antiallergic flavones glycoside from *Kalanchoe pinnatum*. *Jpn. Kokai Tokyo Koho JP 61,118,396*, apud *Chemical Abstracts* 105: 178423q.

3.2.7 Internet pages:

Taylor L 2000. *Plant based drugs and medicines*. <http://www.raintree.com/plantdrugs.htm>, access in October 2009.

4. Abbreviations

Units will be in accordance with the International System (SI) as adopted by the 11th General Conference on Weights and Measures. Common abbreviations to be used are m (meter); cm (centimeter); mm (millimeter); μm (micrometer); nm (nanometer); kg (kilogram); g (gram); mg (milligram); μg (microgram); ng (nanogram); mL milliliter; μL (microliter); s (second); min (minute); h (hour); N (normal); M molar; mM (millimolar); μM (micromolar); SD (standard deviation); SE (standard error); X (mean); Ci (Curie); mp (melting point); bp (boiling point); TLC (thin-layer chromatography); GC (gas chromatography); NMR (nuclear magnetic resonance); MS (mass spectrometry); UV (ultraviolet); CD (circular dichroism); IR (infrared); g instead of rpm; ppm (parts per million); cpm (counts per minute); dpm (disintegrations per minute); Hz (Hertz); LD50 (median lethal dose); LC50 (median lethal concentration); TLV (threshold limit value). When using a word that is asserted to be a proprietary term or trademark, authors must use the symbol ®.

5. Illustrations

5.1 The quality of the illustrations depends on the quality of the originals provided. Figures cannot be modified or enhanced by the production staff of the journal. The graphics must be submitted as part of the manuscript file. Contrast is important.

5.2 Remove all colour from graphics, except for those graphics that author(s) would consider for publication in colour (see Costs section for details).

5.3 Chemical structures should be drawn according to the style set by the American Chemical Society. Preferences for the drawing of structures can be found as a pre-set style in appropriate software packages.

5.4 Upload each figure in .tiff, .jpg or .eps format. The figure number and the top of the figure should be indicated. Lettering must be with Arial font of a reasonable size that will be clearly legible upon reduction and which is consistent within each figure and set of figures. If a key to symbols is required, please include this in the figure legend.

ANEXO B – Orientações para a publicação de artigos no Flavour and Fragrance Journal

General

Flavour and Fragrance Journal [FFJ] publishes original research articles, reviews and special reports on all aspects of flavour and fragrance. Its high scientific standard and international character will be ensured by regional editorial support and a strict refereeing system. Emphasis will be placed on analytical aspects and the important role that analysis in its widest sense plays in the support of research and applications.

As well as essential oils and other natural and naturally derived products, complementary synthetic products will be included, where appropriate. The comprehensive coverage of the journal will be reflected in the wide range of product types embraced, such as fragrances and their compositions, and the flavour, colours and odours of foodstuffs. There are many associated topics of interest, often requiring the use of interdisciplinary techniques. In addition to discussion of their end uses, coverage will include such important integral areas as biomedical sciences and legislation.

The overall aim is to produce a journal of the highest quality which provides a forum for the exchange of a wide variety of information on all aspects of flavours, fragrances and related materials, and which is valued by readers and contributors alike.

Papers must clearly be of scientific value in the field and will be submitted to two independent referees. Contributions must be in English and must not have been published elsewhere, and authors must agree not to communicate the same material for publication to any other journal. It is in the author's interest to ensure accurate and consistent presentation and thus avoid publication delays. There are no page charges.

Presentation of Papers

Manuscript style: Use a standard font of the 12-point type: Times, Helvetica, or Courier is preferred. It is not necessary to double-line space your manuscript.

Tables must be on separate pages after the reference list, and not be incorporated into the main text. Figures should be uploaded as separate figure files.

- During the submission process you must enter 1) the full title 2) the short title of up to 70 characters 3) names and affiliations of all authors and 4) the full address, including email, telephone and fax of the author who is to check the proofs.
- Include the name(s) of any **sponsor(s)** of the research contained in the paper, along with **grant number(s)**.

- Enter an **abstract** of no more than 250 words for all articles. Please see the guidance below on acceptable abstract writing for FFJ.
- **Keywords.** Authors should prepare no more than 5 keywords for their manuscript.

Writing Abstracts

An abstract is a concise summary of the whole paper, not just the conclusions. The abstract should be no more than 250 words and convey the following:

1. An introduction to the work. This should be accessible by scientists in any field and express the necessity of the experiments executed
2. Some scientific detail regarding the background to the problem
3. A summary of the main result
4. The implications of the result
5. A broader perspective of the results, once again understandable across scientific disciplines

It is crucial that the abstract convey the importance of the work and be understandable without reference to the rest of the manuscript to a multidisciplinary audience. Abstracts should not contain any citation to other published works.

Reference Style

References should be cited by superior numbers and listed at the end of the paper in the order in which they appear in the text. Authors should cite available published work. If necessary, cite unpublished or personal work in the text but do not include them in the references list. Journal titles should be italicized and abbreviated in accordance with the “Chemical Abstracts Service Source Index” (CASSI; no commas appear in the journal names).

Journals

- [1] R. K. Harris, A. Nordon, K. D. M. Harris, *Rapid Commun. Mass Spec.* **2007**, 21, 15.

Books

- [2] K. Schmidt-Rohr, H.W. Spiess, *Multidimensional Solid-State NMR and Polymers*, Academic Press, London, **1994**.

- [3] V. Sklenar, in *NMR Applications in Biopolymers*, (Eds: J.W. Finley, S. J. Schmidt, A. S. Serianni), Plenum, New York, **1990**, pp. 63-70.

- [4] The Oncology Website. <http://www.mit.co.oncology/> [24 April 1999]

Illustrations and ChemDraw Rules

Upload each figure as a separate file in either .tiff or .eps format, with the figure number and the top of the figure indicated. Compound figures e.g. 1a, b, c should be uploaded as one figure. Tints are not acceptable. Lettering must be of a reasonable size that would still be clearly legible upon reduction, and consistent within each figure and set of figures. Where a key to symbols is required, please include this in the artwork itself, not in the figure legend. All illustrations must be supplied at the correct resolution:

Tables should be part of the the main document and should be placed after the references. If the table is created in excel the file should be uploaded separately.

Chemical structures should be prepared in ChemDraw either 80mm (onecolumn) or 175mm (twocolumn) widths. However, the one-column format should be used whenever possible as this allows greater flexibility in the layout of the manuscript. Use this ChemDraw Download [Chemdraw Download](#) or use the following settings:

Drawing settings

chain angle	120°
bond spacing	18% of length
fixed length	17 pt
bond width	2 pt
line width	0.75 pt
margin width	2 pt
hash spacing	2.6 pt
Bold width	2.6 pt

Text settings

font	Arial
size	12 pt

Preferences

units	points
tolerances	5 pixels

Authors using different structural drawing programs should choose settings consistent with those above. Compound numbers should be bold, but not atom labels or captions.

ANEXO C – Orientações para a publicação de artigos na Química Nova

GERAL - Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos que cubram as áreas tradicionais da Química bem como artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc, além de artigos de áreas afins, desde que tenham acentuado conteúdo químico.

PREPARAÇÃO DE MANUSCRITOS - Todos os trabalhos deverão ser digitados em espaço duplo, utilizando somente Microsoft Word. A seguir, deve ser gerado um único arquivo no formato *.pdf*, do trabalho todo, para ser submetido através do sistema *on line* de QN. A revista não aceita mais a submissão de trabalhos por outra forma.

A primeira página deverá conter o título do trabalho, nome e endereço dos autores. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão vir imediatamente após o nome de cada autor. Os autores deverão ser agrupados por endereço. O autor para correspondência, que deverá ser o mesmo que submete o artigo *on line*, deverá ser indicado com asterisco (*) e seu e-mail colocado no rodapé da página (um só e-mail).

A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho em inglês (abstract), com no máximo 100 (cem) palavras, e a indicação de 3 palavras-chave (keywords), também em inglês.

As figuras (incluindo gráficos, esquemas, etc) deverão ser em número máximo de 7 figuras simples e ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco). Para número maior ver o item Material Suplementar. As figuras, tabelas, esquemas, etc deverão ser colocadas após as referências e devidamente identificadas pelo respectivo número. Se escaneadas, deverão ser em alta resolução (*800 dpi/bitmap para traços*). No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente, além de boa qualidade gráfica. Considerar que as figuras deverão ter largura máxima de uma coluna (8,5 cm).

Figuras coloridas terão custo de publicação repassado aos autores, quando da publicação. Esse valor só poderá ser informado aos autores quando o trabalho estiver previsto para ser publicado, ocasião em que a gráfica fornece o orçamento.

Para figuras, gráficos, esquemas, tabelas, etc idênticos aos já publicados anteriormente na literatura, os autores deverão pedir permissão para publicação junto à empresa/sociedade científica que detenha os direitos autorais e enviá-la à editoria de QN junto com a versão final do manuscrito.

As referências deverão ser numeradas consecutivamente no texto, na forma de expoentes, após a pontuação (se houver). A lista de referências deverá ser colocada no final do texto. As legendas das figuras, gráficos e esquemas deverão ser colocadas em uma única folha à parte, separadas das figuras. A seguir, deverão ser colocadas as figuras, os gráficos, os esquemas, as tabelas e os quadros. Colocar os títulos acima de cada tabela. No texto, deverá ser indicada apenas a inserção de cada um (a).

Referências

Revistas:

Será utilizada a abreviatura da revista como definida no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://www.cas.org/sent.html>). Caso a abreviatura autorizada de uma determinada revista não puder ser localizada e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, 67, 518.

2. No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue:

Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zadev.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, 19, 708. (CA 85:78051s).

3. Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar doi da seguinte maneira:

Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:

4. Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, 147, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, 7, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, 24, 473.

Patentes:

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

5. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 79 73,771 **1979**. (CA 91:P193174v)

6. Kadin, S.B.; *US pat.* 4,730,004 **1988**. (CA 110:P23729y)

7. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T. *Br PI* 9.604.468-3, **1999**.

Livros:**com editor(es):**

8. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

sem editor(es):

9. Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

Programas de computação (Softwares):

10. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

Teses:

11. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

Material apresentado em Congressos:

12. Ferreira, A. B; Brito, S. L.; *Resumos da 20^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

Páginas Internet:

<http://www.sbq.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

Material não publicado:

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo.
Para material submetido, mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submetido.

Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Os resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.