

Teores de óleo essencial e flavonóides totais em amostras de *Rosmarinus officinalis* L.

Total flavonoid and essential oil contents in samples of *Rosmarinus officinalis* L.

Darlene Magalhães de Almeida^I

Lílian de Lima Chaves^I

Glauciemar Del-Vechio-Vieira^{II}

José de Jesus Ribeiro Gomes de Pinho^{II}

Célia Hitomi Yamamoto^{II}

Orlando Vieira de Sousa^{III}. *

^I Especialista em Controle de Qualidade. Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, CEP36036-330, Juiz de Fora, MG, Brasil.

^{II} Colaborador/Pesquisador. Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, CEP36036-330, Juiz de Fora, MG, Brasil.

^{III} Docente/Pesquisador. Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, CEP36036-330, Juiz de Fora, MG, Brasil.

RESUMO - O presente trabalho avaliou os teores de flavanóides totais e óleos essenciais em amostras de *Rosmarinus officinalis* L. obtidas das cidades de Ubá (A) e de Juiz de Fora (B e C), Minas Gerais, Brasil. Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação. A pesquisa de flavonóides e a determinação de cinzas totais e umidade foram realizadas nas folhas secas e pulverizadas. Os teores de flavonóides totais foram quantificados por espectrofotometria em extratos obtidos por maceração a frio em água, etanol 30, 50, 70 e 99,8%, utilizando rutina como padrão. Os resultados foram demonstrados como média \pm erro padrão e análise de variância seguida do teste de Tukey foi utilizada para medir o grau de significância ($p < 0,05$). As cinzas totais variaram de 5,93 a 8,46% e a umidade foi de 8,80 a 11,00%. Houve variação nos teores de flavonóides totais: A ($165,00 \pm 9,23$ a $331,66 \pm 3,52$ mg/100g), B ($189,33 \pm 7,26$ a $748,00 \pm 5,50$ mg/100g) e C ($94,00 \pm 1,00$ a $866,00 \pm 8,66$ mg/100g). Os teores de óleos essenciais foram: A ($3,93 \pm 0,04\%$), B ($3,12 \pm 0,03\%$) e C ($2,44 \pm 0,04\%$). Os resultados indicam que os teores dos constituintes em *R. officinalis* podem variar conforme procedência da amostra e diferentes concentrações de etanol utilizados no processo de extração.

Palavras-chave: Quimioterapia adjuvante. Estabilidade de medicamentos. Fluorouracil.

ABSTRACT - This study evaluated the levels of total flavonoids and essential oils extracted by hydrodistillation in samples of *Rosmarinus officinalis* L. obtained from Ubá (A) and Juiz de Fora (B and C), Minas Gerais, Brazil. Flavonoid screening and total ash and humidity levels were quantified from both dried and powdered leaves. Total flavonoid levels were quantified by spectrophotometry in extracts obtained by cold maceration in water and ethanol solutions (30, 50, 70 and 99.8%) using rutin as a standard. The results were expressed as the mean \pm standard error, and the one-way analysis of variance test followed by Tukey's test was used to measure statistical significance ($p < 0.05$). The total ash and humidity levels ranged from 5.93 to 8.46% and 8.80 to 11.00%, respectively. The variations in total flavonoid levels for A, B and C were 165.00 to 331.66 mg/100 g, 189.33 to 748.00 mg/100 g and 94.00 to 866.00 mg/100 g, respectively. The amount of essential oils produced from rosemary leaves for A, B and C was $3.93 \pm 0.04\%$, $3.22 \pm 0.03\%$ and $2.44 \pm 0.04\%$, respectively. The results indicate that the constituent content levels in *R. officinalis* may vary according to the source and concentration of ethanol used in the extraction process.

Keywords: Rosemary. Phytotherapy. Plant extracts.

INTRODUÇÃO

Plantas medicinais constituem uma das mais importantes fontes de substâncias ativas com potencial terapêutico e são freqüentemente usadas para tratar uma variedade de doenças (KAMBOJ, 2000). No entanto, fatores genéticos, ambientais, período de coleta, armazenamento e contaminações por microrganismos alteram os teores das substâncias no vegetal, o que pode comprometer suas propriedades terapêuticas (ANDRADE & GOMES, 2000; SKOULA *et al.*, 2000; CARVALHO-FILHO *et al.*, 2006). Dessa forma, a quantificação dos teores de constituintes é fundamental para garantir o uso seguro e racional de plantas medicinais e fitoterápicos.

Rosmarinus officinalis L. (Lamiaceae), conhecida como alecrim, é uma planta medicinal usada como estimulante, tônico, carminativo, emenagogo, desinfetante, anti-séptico, tratamento de tosse, problemas estomacais, febres e queda de cabelo (PORTE & GODOY, 2001). Entre os constituintes encontrados, destacam-se diterpenos, triterpenos, flavonoides, quinonas, taninos, saponinas e alcaloides (OKAMURA *et al.*, 1994; DEL BANO *et al.*, 2004; MAHMOUD *et al.*, 2005). O óleo essencial contém pineno, canfeno, borneol e cineol como principais componentes (FU *et al.*, 2007) e possui atividades antimicrobiana (COLLINS & CHARLES, 1987; SOLIMAN *et al.*, 1994; FU *et al.*, 2007; BOZIN *et al.*, 2007; GENENA *et al.*, 2008) e antioxidante (BOZIN *et al.*, 2007; GENENA *et al.*, 2008). Extratos de *R. officinalis* têm demonstrado efeitos diurético (HALOUI *et al.*, 2000), antiulcerogênico (DIAS *et al.*, 2000), anti-proliferativo e antioxidante (CHEUNG & TAI, 2007; GENENA *et al.*, 2008).

Considerando os usos populares, as propriedades farmacológicas e as substâncias identificadas, o presente estudo avaliou os teores de cinzas totais e umidade, assim como pesquisou e determinou os teores de flavonóides totais e do óleo essencial em amostras das folhas de *Rosmarinus officinalis* L.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e preparo das amostras

Amostras de alecrim, denominadas em A, B e C, foram obtidas na cidade de Ubá (MG) em 03/02/2007 (amostra A), no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora em 06/02/2007 (amostra B) e no comércio de Juiz de Fora (MG) em 02/03/2007 (amostra C). Uma excisada de referência foi depositada no Herbário de Departamento de Botânica, da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) sob nº 48253.

Após a aquisição do material, as folhas foram submetidas à secagem a 50°C, sob ventilação forçada e trituradas em liquidificador industrial seguida de tamisação em malha 80 para a obtenção dos extratos e extração do óleo essencial.

Extração por maceração

Os extratos foram obtidos por maceração estática a frio por 24 horas em água 100% e em diferentes concentrações com etanol 30%, 50%, 70% e 99,8% em três repetições.

Determinação dos teores de cinzas totais e umidade

Após a calcinação dos cadinhos, 1g de cada amostra foi colocado em cadinho e levado a mufla, com elevação da temperatura até 600°C, para incineração durante 4 horas. Já o teor de umidade foi determinado com 1g de cada amostra em um sistema de secagem infravermelho SI4040 GEHAKA acoplado a uma balança digital BG200. Os valores de cinzas totais e umidade foram obtidos através da média de três determinações em cada amostra.

Pesquisa e quantificação de flavonóides totais

Os flavonóides foram pesquisados através das seguintes reações de identificações: reação com cloreto de alumínio

(AlCl_3), reação com ácido bórico (H_3BO_3), reação com hidróxido de sódio (NaOH) e reação de Shinoda ou de cianidina (MATOS, 1997).

A quantificação dos teores de flavonóides foi realizada por método espectrofotométrico (Espectrofotômetro B572A Micronal) (SOBRINHO *et al.*, 2008). Os extratos obtidos por maceração foram semipurificados com clorofórmio através da extração líquido:líquido e a reação colorimétrica foi realizada com 2 mL de cada extrato, 0,6 mL de ácido acético glacial, 10 mL de piridina:etanol (2:8) e 2,5 mL de cloreto de alumínio 8% em etanol, completando para 25 mL com água destilada, em um balão volumétrico foi usada como padrão a rotina para a obtenção da reta de calibração. Os dados foram submetidos à análise de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, sendo calculada a equação da reta e o coeficiente de correlação (r), as análises das amostras foram realizadas em triplicata a 420 nm.

Extração do óleo essencial

O óleo essencial foi obtido de 100 g das folhas secas e pulverizadas através da extração por hidrodestilação, usando o aparelho de Clevenger. As extrações foram feitas durante 2 horas após o início da ebulição e em triplicatas (MATOS, 1997).

Análises estatísticas

Os resultados foram demonstrados através da média \pm erro padrão e a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey foi utilizada para medir o grau de significância para $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores médios de cinzas totais das amostras analisadas variaram de 5,93 a 8,46%, enquanto a umidade foi de 8,80 a 11,00%, produzindo uma variação total de 10,33 a 14,98% (Tabela 1).

A presença de minerais não voláteis indica impurezas inorgânicas, tais como pequenos grãos de areia, que podem constituir contaminantes e influenciar no teor de cinzas totais (Tabela 1). No entanto, não foram detectados grãos de areia nas amostras analisadas. Já um alto teor de umidade pode ocasionar contaminação por microrganismos, o que degradaria os constituintes ativos das matérias-primas, alterando os teores e suas propriedades farmacológicas (MING, 1994).

Os resultados das reações de identificação para os flavonóides nas amostras, observado que nas reações com AlCl_3 , H_3BO_3 e NaOH, as amostras B foram as mais intensas, indicando maior teor de flavonóides (Tabela 2).

Tabela 1. Teores médios de cinzas totais e umidade em amostras de *R. officinalis*.

Ensaio	Teores médios (%)		
	Amostra A	Amostra B	Amostra C
Cinzas totais	8,46	7,15	5,93
Umidade	11,00	8,90	8,80
Total	19,46	16,05	14,73

Tabela 2. Reações de identificação para flavonóides em amostras de *R. officinalis*.

Reações	Amostras		
	A	B	C
AlCl_3	++	+++	++
H_3BO_3	+	++	+
NaOH	+	+++	+
Shinoda	-	-	-

R. officinalis (alecrim) apresentou reações positivas para flavonóides, confirmando a triagem fitoquímica que registra a presença de flavonóides nas folhas da espécie (MATOS, 2000; LORENZI & MATOS, 2002; CORDEIRO *et al.*, 2006). Substâncias flavonoidicas são detectadas por reações cromáticas que podem ser capazes de distinguir grupos particulares, que relacionam-se, particularmente, com propriedades do núcleo fundamental cromona ou com a presença de hidroxilas ligadas aos núcleos aromáticos, por exemplo, à presença de hidroxilas pode ser evidenciada através de reações com bases alcalinas ou sais metálicos (COSTA, 1982).

Considerando a reação com AlCl_3 , foi observada uma fluorescência amarelada que é indicativa da presença de flavonas e flavonóis. A reação com ácido bórico determina hidroxila livre na posição C-5 no núcleo flavonoidico, evidenciando a presença de flavonóis. A solução de NaOH produziu uma reação com coloração amarela, sugerindo a presença de flavonas, flavonóis, flavononas, chalconas e isoflavonas. Esta reação não é específica a um determinado grupo de flavonóides (COSTA, 1982).

A determinação dos teores de flavonóides totais nas amostras de *R. officinalis* foi realizada por espectrofotometria usando rotina como padrão. O espectro de absorção da rotina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ definiu o maior comprimento de ondas em 420 nm (Figura 1A), o qual foi usado para a montagem da reta de calibração (Figura 1B). Dessa forma, foi calculado os teores de flavonóides totais, equivalentes a rotina, pelas absorbâncias das amostras.

Os teores de flavonóides equivalentes a rotina variaram para a amostra A de $165,00 \pm 9,23$ a $331,66 \pm 3,52$, para a amostra

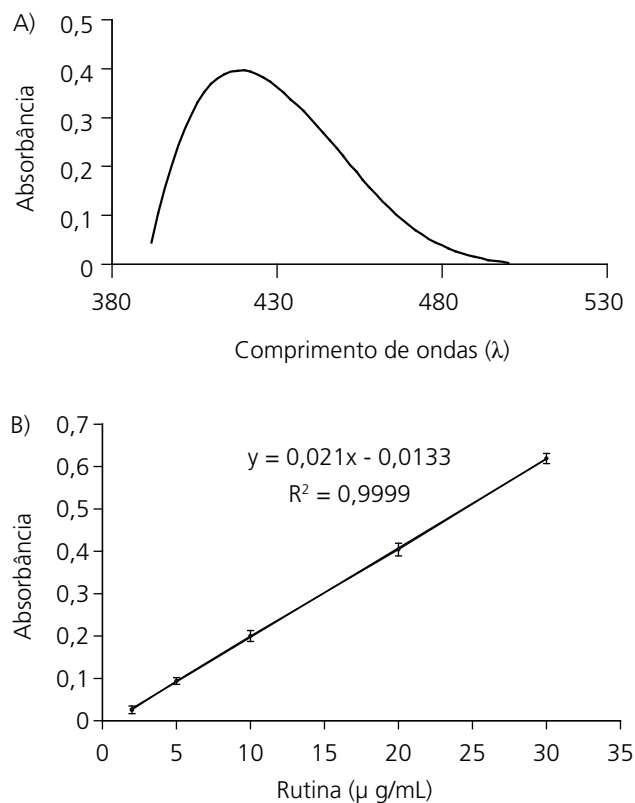


Figura 1. Espectro de absorção (A) e reta de calibração (B) da rutina.

B de $189,33 \pm 7,26$ a $748,00 \pm 5,50$ e para a amostra C de $94,00 \pm 1,00$ a $866,00 \pm 8,66$ (Tabela 3). Embora os valores em B e C não mostrassem diferença significativa na extração em etanol 50% e com exceção da extração em etanol 99,8%, a amostra C produziu maiores quantidades de flavonóides. Além disso, a extração em etanol 99,8% produziu diferença significativa ($p < 0,05$) entre os teores de flavonóides totais das amostras analisadas (Tabela 3).

Embora constituintes flavonóidicos já tenham sido identificados em *R. officinalis* (OKAMURA *et al.*, 1994; DEL BANO *et al.*, 2004), os resultados das reações de identificação para flavonóides comprovam esse achado, podendo ser um dos procedimentos a serem realizados na avaliação da qualidade da espécie estudada.

Os resultados dos teores de flavonóides evidenciaram uma redução na extração em etanol 100% (Tabela 3). Isso pode ser devido a uma maior quantidade de flavonóides não-glicosilados que são extraídos em solventes menos polares (OKAMURA *et al.*, 1994; DEL BANO *et al.*, 2004). Com exceção da amostra B, a extração aquosa também foi maior do que a extração em etanol 100% (Tabela 3). Isso sugere que a quantidade de flavonóides pode variar conforme a procedência das amostras e os solventes utilizados no processo de extrativo. No entanto, fatores ambientais e genéticos podem influenciar no conteúdo de constituintes,

Tabela 3. Teores médios de flavonóides totais em amostras de *R. officinalis* submetidas a diferentes processos de extração.

Extratos	Teores médios de flavonóides totais (mg/100 g)		
	Amostra A	Amostra B	Amostra C
Aquoso	$277,33 \pm 1,66A$	$189,33 \pm 7,26$	$479,66 \pm 6,35$
EtOH 30%	$331,66 \pm 3,52B$	$256,33 \pm 6,64$	$862,66 \pm 8,37B$
EtOH 50%	$313,66 \pm 7,53B$	$748,00 \pm 5,50b$	$761,00 \pm 9,53b$
EtOH 70%	$268,00 \pm 4,62A$	$641,66 \pm 6,64$	$866,00 \pm 8,66B$
EtOH 99,8%	$165,00 \pm 9,23$	$327,66 \pm 6,74$	$94,00 \pm 1,00$

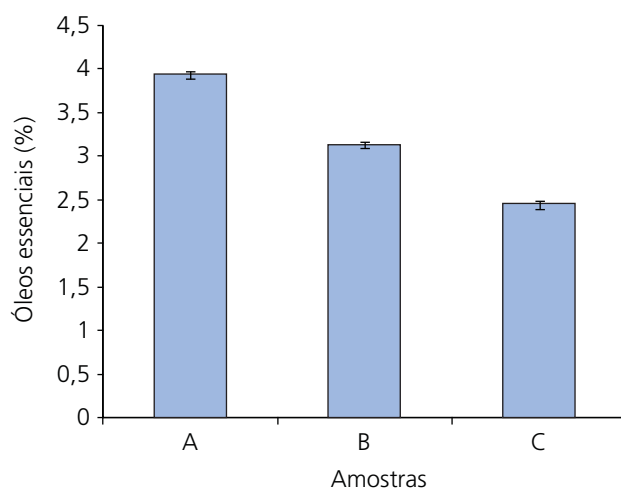
* Os dados são médias de três repetições \pm erro padrão.

* Letras maiúsculas iguais na mesma coluna, as médias são estatisticamente iguais após análises de variância seguido do teste de Tukey para $p < 0,05$.

* Letras minúsculas iguais na mesma linha, as médias são estatisticamente iguais após análises de variância seguida do teste de Tukey para $p < 0,05$.

o que pode explicar essa variação entre as amostras estudadas (ANDRADE & GOMES, 2000; SKOULA *et al.*, 2000; CARVALHO-FILHO *et al.*, 2006; PAPAGEORGIOU *et al.*, 2008).

Os teores de óleos essenciais nas diferentes amostras de alecrim foram diferentes entre si ($p < 0,05$): A = $3,93 \pm 0,04\%$, B = $3,12 \pm 0,03\%$ e C = $2,44 \pm 0,04\%$. Com isso, a amostra A contém maior quantidade de óleo essencial em comparação com as amostras A e B (Figura 2)



*O teor de óleos essenciais nas amostras analisadas foram diferentes entre si após análises de variância seguida do teste de Tukey para $p < 0,05$.

Figura 2. Teor de óleos essenciais nas folhas das amostras do alecrim.

Os teores de óleo essencial das amostras de alecrim foram iguais ou superiores àqueles encontrados na literatura para o material seco e pulverizado (PORTE & GODOY, 2001; OZCAN & CHALCHAT, 2008; STEFANOVITS-BÁNYAI et al., 2008). Quando se refere às folhas frescas de *R. officinalis*, o teor de óleos essenciais pode variar de 0,368 a 1,691 mL/100g e, normalmente, é menor do que os valores obtidos em folhas secas devido a perda de umidade após secagem (GENEVA et al., 2008; ATTI-SANTOS et al., 2005). O valor do teor de óleo essencial da amostra A foi duas vezes maior quando comparado às folhas frescas (Figura 2).

CONCLUSÕES

Os resultados indicam que os teores dos constituintes analisados podem variar conforme a procedência da amostra e concentração do etanol utilizado no processo de extração, assim como fatores ambientais, como época da coleta, secagem e armazenamento, podem também ter influenciado nos teores dos constituintes quantificados. Esses resultados podem contribuir para o estabelecimento de parâmetros de controle de qualidade e isolamento de novas moléculas flavonoidicas de *R. officinalis*, assim como explorar, em nível clínico e laboratorial, suas potencialidades terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A.M. & GOMES, S.S. Influência de alguns fatores não genéticos sobre o teor de óleo essencial em folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. *Floresta e Ambiente* 27(1): 181-189, 2000.
- ATTI-SANTOS, A.C.; ROSSATO, M.; PAULETTI, G.F. et al. Physico-chemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48(6): 1035-1039, 2005.
- BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SAMOJLIK, I. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 55(19): 7879-7885, 2007.
- CARVALHO-FILHO, J.L.S.; BLANK, A.F.; ALVES, P.B. et al. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. *Rev. Bras. Farmacog.* 16(1): 24-30, 2006.
- CHEUNG, S. & TAI, J. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncol. Rep.* 17(6): 1525-1531, 2007.
- COLLINS, M.A. & CHARLES, H.P. Antimicrobial activity of carnosol and ursolic acid: two anti-oxidant constituents of *Rosmarinus officinalis*. *Food Microbiol.* 4(4): 311-315, 1987.
- COSTA, A.C. *Farmacognosia*. 2. ed., Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982. 1032 p.
- CORDEIRO, C.H.G.; SACRAMENTO, L.V.S.; CORRÊA, M.A.; PIZZOLITTO, A.C.; BAUAB, T.M. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. *Rev. Bras. Ciên. Farmac.* 42(3): 395-404, 2006.
- DEL BANO, M.J.; LORENTE, J.; CASTILLO, J. et al. Flavonoid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Postulation of a biosynthetic pathway. *J. Agric. Food Chem.* 52(16): 4987-4992, 2004.
- DIAS, P.C.; FOGGIO, M.A.; POSSENTI, A. et al. Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L. *J. Ethnopharmacol.* 69(1): 57-62, 2000.
- FU, Y.; ZU, Y.; CHEN, L. et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytother. Res.* 21(10): 989-994, 2007.
- GENENA, A.K.; HENSE, H.; SMÂNIA JUNIOR, A. et al. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) – a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 28(2): 463-469, 2008.
- HALOUI, M.; LOUDEC, L.; MECHEL, J.B. et al. Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaurium erythraea*. *J. Ethnopharmacol.* 71(3): 465-472, 2000.
- KAMBOJ, V.P. Herbal medicine. *Curr. Sci.* 78(1): 35-39, 2000.
- LORENZI, F.J.H.; MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais do Brasil - nativas e exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002. 512p.

- MAHMOUD, A.A.; AL-SHIHRY, S.S. & SON, B.W. Diterpenoid quinones from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Phytochemistry* 66(14): 1685-1690, 2005.
- MATOS, F.J.A. Introdução à fitoquímica experimental. 2 ed., Fortaleza: Edições UFC, 1997. 141 p.
- MATOS, F.J.A. Plantas Medicinais - Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. 2.ed., Fortaleza: Imprensa Universitária UFC, 2000. 344p.
- MING, L.C. Estudo e pesquisa de plantas medicinais na agronomia. *Hortic. Bras.* 12(1): 3-9, 1994.
- OKAMURA, N.; HARAGUCHI, H.; HASHIMOTO, K. et al. Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochemistry* 37(5): 1463-1466, 1994.
- OZCAN, M.M. & CHALCHAT, J.C. Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 59(7-8): 691-698, 2008.
- PAPAGEORGIOU, V.; GARDELI, C.; MALLOUCHOS, A. et al. Variation of the chemical profile and antioxidant behavior of *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Miller grown in Greece. *J. Agric. Food Chem.* 56(16): 7254-7264, 2008.
- PORTE, A. & GODOY, R.L.O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. *BCPPA* 19(2): 193-210, 2001.
- SOBRINHO, T.J.S.P.; SILVA, C.H.T.P.; NASCIMENTO, J.E. et al. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. *Rev. Bras. Ciênc. Farmac.* 44(4): 683-689, 2008.
- SKOULA, M.; ABBES, J.E. & JOHNSON, C.B. Genetic variation of volatiles and rosmarinic acid in populations of *Salvia sufruticosa* Mill. growing in Crete. *Bioch. Syst. Ecol.* 28(6): 551-561, 2000.
- SOLIMAN, F.M.; EL-KASHORY, E.A.; FATHY, M.M. et al. Analysis and biological activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Egypt. *Flavour Fragr. J.* 9(1): 29-33, 1994.
- STEFANOVITS-BÁNYAI, É.; TULOK, M.H.; HEGEDÛS, A. et al. Antioxidant effect of various rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clones. *Acta Biol. Szeged.* 47(1-4): 111-113, 2003.

Recebido em: 05/02/2009
Revisado em: 31/03/2009, 24/11/2009, 22/06/2010,
04/10/2010 e 17/11/2010
Aceito em: 11/01/2010

Correspondência:

Orlando Vieira de Souza
orlando.sousa@ufjf.edu.br