



# Análise Química da extração por aparelho de Clevenger para quantidades preparativas de compostos de enxofre extraídos das Folhas da *Mansoa Hirsuta* D.C Bignoniacea

Daniel de M. Silva<sup>1,2</sup>; Marcelo E. Rocha<sup>1,2</sup>; Jadson M. Souza<sup>1</sup>; Lorena Savazini<sup>2</sup>; Willian de B. Brandão<sup>1</sup>; Sulene Alves Araujo<sup>1,2</sup>

1- Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Ciências e Tecnologias, Av. José Moreira Sobrinho s/n, CEP- 45.208-091 Jequiézinho, Jequié-Ba..

2- Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Mestrado Profissional em Química, Av. José Moreira Sobrinho s/n, CEP- 45.208-091 Jequiézinho, Jequié-Ba..

**Palavras-Chave:** metabolitos secundários, voláteis, Cromatografia gasosa.

## Introdução

A *Mansoa hirsuta* D.C pertence à família das Bignoniaceae, compreendendo aproximadamente 800 espécies, com ocorrência predominante nas regiões tropicais. O Brasil possui uma enorme diversidade de espécies dessa família, possuindo uso popular como adstringente, para tratamento de reumatismo, contra febre, diarreia e infecções microbianas<sup>1</sup>. Compostos como naftoquinonas, lignanas, triterpenos e flavonoides foram isolados de espécies da família Bignoniaceae, porém sua composição química continua desconhecida<sup>2</sup>.

Os constituintes conhecidos da *M. hirsuta* D.C incluem terpenoides e esteróis isolados das folhas e álcoois alifáticos mono- e di-hídricos que são considerados como os constituintes antifúngicos de frações menos polares, extratos brutos de *M. hirsuta* D.C inibiram o crescimento de culturas padronizadas de *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum*<sup>2</sup>. Diversas plantas da família Bignoniaceae são popularmente utilizadas no Brasil para amenizar a febre, como adstringente, para tratar reumatismo, diarreia, câncer e infecções microbianas<sup>3</sup>.

A principal forma de obter os constituintes voláteis biologicamente ativos e de interesse farmacológico em laboratórios de recursos naturais é através de métodos de extração por arraste a vapor. Existem vários tipos de sistemas extratores de óleos essenciais eficientes, mas o sistema clevenger é o mais conhecido e bastante utilizado em escala laboratorial, podendo operar em circuito aberto ou fechado<sup>4</sup>.

Para realizar análises bioquímicas e elucidativas dos compostos de enxofre presentes no óleo essencial, necessita-se de quantidades preparativas desse material. Um estudo que possibilite otimizar o processo de extração desses voláteis pode permitir obter volumes quantitativos tornando viável a prospecção por componentes com atividade biológica<sup>5</sup>.

Alguns espécimes vegetais possuem em sua estrutura foliar compostos com enxofre, que são metabólitos secundários derivados de aminoácidos. As substâncias com atividade biológica originam-se após a hidrólise de um precursor contido no vegetal pela ação de enzimas que se encontram em compartimentos distintos no vegetal intacto, está só entra em contato com o seu substrato após o rompimento das paredes celulares<sup>6</sup>.

Segundo Carvalho<sup>7</sup>, existem duas principais classes moleculares de origem vegetal que possuem enxofre com importância biológica. Uma dessas classes são os tio-

glicosídeos, apresentando em sua composição uma aglicona ligada a uma unidade de açúcar, que, através de uma reação de rearranjo espontâneo, dá origem ao isotiocianato o composto majoritário e responsável por grande número de atividades biológicas. Outra classe de compostos de enxofre é a aliina, tendo sua principal ocorrência no alho. A aliina, pela ação da enzima aliinase, origina a alicina que, juntamente com seus produtos de degradação, é responsável pelas atividades biológicas e pelo odor característico do alho. Um odor semelhante é bastante característico da *M. hirsuta* D.C, por essa característica organoléptica essa planta é popularmente conhecida como cipó-de-alho,

Através da análise dos voláteis obtidos com etanol por aparelho de clevenger, foi descrita a presença de disulfeto de dialila e trissulfeto de dialila na *M. hirsuta* D.C. Considerando a importância biológica de compostos de enxofre derivados de plantas e que no único estudo que relata a extração desses compostos extraídos da *M. hirsuta* D.C as quantidades citadas no artigo são apenas qualitativas<sup>8</sup>. Este trabalho foi realizado com o intuito de conseguir padronizar uma metodologia, utilizando o aparelho de clevenger para que se obtenha quantidades preparativas do óleo com alta concentração destes sulfetos possibilitando, em um futuro próximo, a realização de prospecção farmacológica e elucidação estrutural, afim de seguir um planejamento racional na descoberta de novas moléculas e novas atividades biológicas, agregando conhecimento sobre as plantas que ocorrem na região semiárido do sudoeste baiano.

## Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Química e Exatas - UESB. O material vegetal utilizado constituiu-se de folhas de *M. Hirsuta* D.C coletadas no município de Boninal-BA (S 12° 26' 36,5'' W 41° 55' 9.7''). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo comparadas as amostras de folhas secas e in natura, os tempos de extração de 1, 2 e 3 horas, e a extração em cada tempo foi realizada em triplicata. A secagem do material ocorreu a 40°C por 12h em estufa da marca DeLeo™, modelo TLK48 e a trituração em moinho tipo forrageira.

Foi escolhido como metodologia para extração do óleo essencial o arraste a vapor, sendo essa metodologia amplamente descrita na literatura, possuindo artigos que corroboram com a ideia dessa metodologia ser a mais eficaz dentro do âmbito laboratorial para realizar a extração de compostos voláteis<sup>9</sup>. Outro ponto positivo é o baixo custo, quando comparado com os métodos tecnológicos mais avançados como, por exemplo, a extração com fluido supercrítico<sup>10</sup>.

Para otimizar o processo de extração foi realizado uma revisão sistemática integrativa na literatura, a fim de observar os intervalos de tempos em que ocorrem os melhores rendimentos para a extração de vegetais.

Os artigos foram obtidos e consultados no período de junho a outubro de 2018. Os termos na língua portuguesa foram utilizados para pesquisa junto ao SciELO (cientific Electronic Library Online) e Portal CAPES (coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), os termos na língua inglesa foram utilizados para pesquisa no banco de dados internacional ERIC (Educational Resources Information Center). Mediante todos os resultados das buscas, foi realizada a seleção dos documentos de interesse. O critério de escolha dos artigos foram a presença de termos encontrados no título e resumos, referente ao tempo de extração de voláteis e necessariamente com a utilização do aparelho de clevenger<sup>11, 12, 13, 14, 15, 16, 17</sup>. Prosseguiu-se o experimento com a extração em três diferentes intervalos de tempo, 1,2 e 3 horas, todos em triplicata.

O equipamento empregado na extração dos óleos essenciais por destilação por arraste a vapor é composto por uma manta aquecedora, um balão de fundo redondo com volume de 2L; e um aparelho clevenger. O fluido de refrigeração utilizado no condensador é água refrigerada em um banho termostático com reciclo (em torno de 10°C).

Após a obtenção de quantidades preparativas dos compostos voláteis, para otimizar

a retirada dos voláteis do aparelho é realizada uma adição de clorofórmio para solubilizar os componentes oleosos. Através da evaporação do clorofórmio o resultante é ainda submetido a um processo de secagem utilizando o agente secante sulfato de sódio. A retirada do solvente das amostras foi realizada com gás argônio pressurizado. Posteriormente realizou-se uma análise comparativa com os volumes de voláteis obtidos, para a identificação do tempo de extração que apresenta um melhor rendimento.

Foi realizado um teste de cromatografia em camada delgada em placa de sílica. A partir de uma placa de 25 x 25 cm, aplicando um corte limpo com tesoura, formando uma placa de 4 cm de largura e 8 cm de altura. A cerca de 1 cm da beirada inferior foi demarcado uma linha paralela de largura, utilizando um lápis de grafite macio. Os solventes utilizados na fase móvel foram uma mistura de acetato de etila/n-hexano, na respectiva proporção de 7/3. As placas foram posteriormente analisadas sobre feixes de luz de 254nm e 356nm. A análise por cromatografia gasosa-espectrometria foi realizada em aparelho Shimadzu QP5050 (no Departamento de Química da UFAL). Operando em coluna capilar apolar HP-1 (30 m x 0,25 mm i.d x 0,25 µm de espessura do filme), o gás de arraste utilizado foi o hélio (1 ml/min). A amostra foi energizada com 70 eV, corrente do filamento 220 µA, a temperatura da fonte foi de 190°C e a voltagem do multiplicador 2000 V.

A reação de caráter qualitativo para identificação de compostos de enxofre que foi realizada é denominada ensaio de Lassaigne. Foi realizado o preparo da solução de Lassaigne, obedecendo as seguintes etapas: foi cortado uma pequena amostra de sódio metálico (cinco vezes a mais que a amostra a ser analisada) com uma pinça, enxugando a amostra de sódio metálico com papel absorvente em um tubo de ensaio seco, Adicionado aproximadamente 0,030 g da amostra e aquecer o tubo em chama baixa e depois lentamente em chama alta, durante aproximadamente 60 segundos, deixando-o esfriar posteriormente, acrescentou-se álcool etílico (etanol) aos poucos, até não haver mais resíduos de sódio, por fim, Adicionar 5 ml de água e filtrar a mistura. Para a determinação da presença de enxofre na amostra é necessário acidificar a amostra com ml de ácido acético, acrescentando posteriormente 5 gotas de acetato de chumbo 1%, a formação do precipitado negro indica a formação de PbS, consequentemente a presença de compostos de enxofre nos voláteis da *Mansoa hirsuta* DC<sup>18</sup>.

## Resultados e Discussão

A O processo de extração foi realizado inicialmente utilizando um aparelho de clevenger acoplado a um balão de fundo redondo com capacidade para 10L, a manta aquecedora utilizada possuía uma concavidade proporcional ao balão. O volume e a temperatura do vapor d'água foram maiores do que a capacidade de resfriamento do termocirculador, ocorrendo o extravasamento da mistura de água e material vegetal, inviabilizando assim a continuação do experimento nessas referidas proporções.

O volume do balão foi alterado para 2L, bem como o modelo da manta aquecedora, visando a compatibilidade com o volume do balão. Após essa alteração não houve incidentes que comprometessem o experimento.

A primeira extração foi realizada com 35g da folha da *M. Hirsuta* D.C *in natura* e triturada. Após uma hora de extração não foi possível coletar quantidades preparativas do

óleo essencial, o procedimento de extração por uma hora foi realizado em triplicata (totalizando 105g), sendo que em nenhuma das tentativas foi possível quantificar o óleo extraído, devido a baixíssima quantidade. Seguindo os mesmos materiais, métodos e amostra, foi realizado o procedimento de extração em triplicata com o tempo de duas horas, também não sendo possível observar quantidades preparativas de óleo após esse período.

A Figura 1 mostra o resultado obtido da extração nesse período de tempo, ilustrando semelhantemente o ocorrido na repetição em triplicata desses procedimentos.

Figura 1: Óleo resultante de uma hora de extração da *M. hirsuta* D.C



Fonte: Própria.

A extração por cleveger das folhas de *M. hirsuta* DC. secas a 60°C e trituradas seguiu a mesma metodologia, porém, o total de material vegetal utilizado nas extrações em triplicata foi de 580g (o processo de secagem das folhas torna seu volume menor, possibilitando o uso de uma maior quantidade amostral), também não apresentando quantidades preparativas do óleo após os períodos de extração de uma e duas horas.

No processo de extração das folhas in natura da *M. hirsuta* D.C por três horas foi observado visualmente um aumento no rendimento do óleo, tanto nas folhas in natura quanto nas secas em estufa a 60°C, sendo replicado o procedimento 3 vezes antes de retirar o óleo do aparelho, sendo que sua retirada separadamente nas três etapas poderia suscitar uma perda amostral significativa, preferiu-se então acumular no aparelho o resultado das

extrações em triplicata de três horas e depois da sua retirada com a adição de um solvente apolar.

O solvente utilizado para otimizar a retirada do óleo essencial do aparelho de clewenger foi o clorofórmio. Após a retirada do óleo, este possuía uma certa quantidade de água, decorrente da natureza do processo de extração por arraste a vapor. A amostra foi posta em um refrigerador para que a água que compunha a mistura solidificasse, sendo assim extraída com maior facilidade, retirada a porção solidificada de água, foi adicionado um agente secante, o sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). O recipiente utilizado para armazenar o extrato foi previamente pesado e o valor identificado e fixado com um adesivo, esse recipiente possui vedação para evitar a perda de compostos voláteis. (Figura 2)

Figura 2: Resultado das extrações em triplicata de 3 horas, contendo o solvente clorofórmio.



Fonte: Própria.

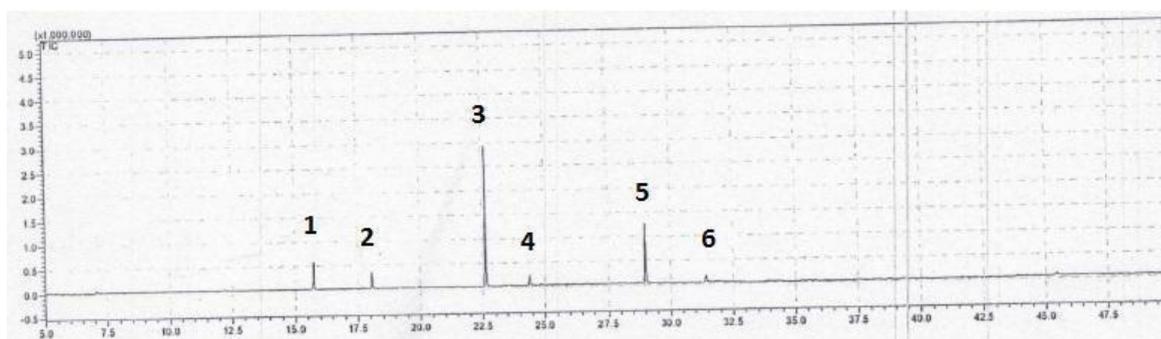
Para retirar o solvente do extrato foi realizado um processo de evaporação por sopro utilizando o gás argônio, direcionando o gás para as amostras através de uma agulha, criando um fluxo sobre a superfície do líquido, mudando assim o equilíbrio entre a fase de vapor e a fase líquida, permitindo a evaporação do clorofórmio. Os frascos foram novamente pesados, sendo calculada a diferença entre o peso final e o inicial, obtendo assim o valor em gramas do óleo essencial obtido.

O peso do óleo obtido da amostra *in natura* da *M. hirsuta* D.C após evaporação do solvente foi de 0,031g, representando um rendimento de 0,031%. Para a amostra seca o valor foi de 0,177g representando 0,030% de rendimento.

Ainda na Figura 2 esquerda está representada o óleo obtido da *M. hirsuta* D.C *in natura* e triturada, a direita a amostra seca e triturada e ao centro a mistura de ambas. A amostra *in natura* apresentou uma grande porcentagem de retenção no ponto de partida, enquanto a amostra seca apresentou pontos distintos de retenção na placa, indicando uma maior quantidade de compostos apolares no óleo obtido através da amostra seca. Esse processo pode ser explicado por conta dos diferentes processo de trituração que as amostras foram submetidas, sendo a planta *in natura* triturada manualmente (menos eficiente), enquanto a amostra seca foi triturada em moinho. Não foi possível a trituração por moinho da amostra *in natura* por conta do seu maior volume e resistência a cisão laminar. Segundo Ancri<sup>20</sup>, compostos de enxofre principalmente os voláteis responsável pelo aroma e por características microbiológicas como o dissulfeto de dialila, são formados através do rompimento de estruturas celulares contidas no alho, fazendo com que a enzima alicina degrade aminoácidos gerando esses compostos. Se esse processo enzimático que ocorre no alho ocorrer também nas folhas da *M. hirsuta* DC, isso resultaria em uma menor formação desses compostos voláteis de enxofre, sendo o processo de trituração manual menos eficiente do que por moinho.

Em parceria com o departamento de química da UFAL, o óleo essencial obtido através da extração de clevenger por 3 horas em triplicata da amostra *in natura*, foi submetido ao aparelho de cromatografia gasosa-espectrometria.

Figura 5: Cromatografia gasosa-espectrometria do óleo obtido da extração por clevenger da *M. hirsuta* DC. *in natura* triturada.



Fonte: Própria.



Tabela 1: Dados dos picos do fragmentograma referente ao óleo obtido da amostra da *M. hirsuta* D.C in natura triturada.

Picos	Tempo de retenção (minutos)	M/Z	Abundância relativa (%)	Nome
1	15.74	148	10.51	Dissulfeto de dialila
2	18.07	138	6.35	1,2-Diotiolato, 1,1-dioxido
3	22.62	178	54.09	Trissulfeto de dialila
4	24.38	89	3.98	1,2 diacilciclopentano
5	28.99	210	22.63	Tetrasulfeto de dialila

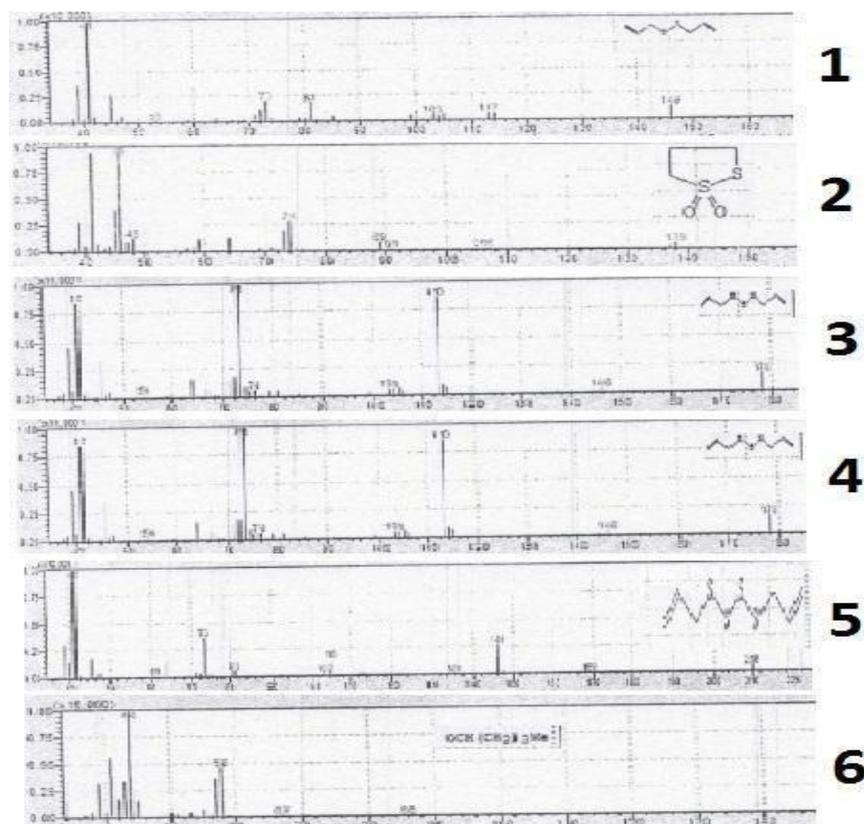
Fonte: Própria

A análise do gráfico da Figura 5 possibilita a observação da existência de 6 picos, possuindo um intervalo significativo, não ocorrendo sobreposição, indicando diferentes compostos com polaridades distintas, esses compostos sugeridos estão descritos na Tabela 1. O tempo de retenção está associado a polaridade, por conta da coluna utilizada como fase estacionária ser apolar, o tempo de retenção torna-se inversamente proporcional a polaridade.

A padrão de afastamento dos picos 1,3 e 5 indicam uma séria homóloga, com tempos de retenção de 15,7, 22,6 e 29 minutos, com abundância de 10,5, 54 e 22,6% respectivamente. A da análise das massas dos íons moleculares representadas na Figura 6, sugere que o primeiro pico represente o diallyl disulphide (M/Z 146, C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>S<sub>2</sub>, tempo de retenção 15,7 minutos e abundancia de 10,51%), o pico dois: 1,2-Dithiolane, 1,1 dioxide (M/Z 138, C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, tempo de retenção 18 minutos e abundância de 6,35%), pico três: trissulfide, di-2-propenyl (M/Z 178, C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>S<sub>3</sub>, tempo de retenção 22,6 minutos e abundância de 54%), pico quatro: dithiacyclopentane (M/Z 89, C<sub>3</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub>S<sub>1</sub>, tempo de retenção 24,38 minutos e abundância de 3,98%), pico cinco: (M/Z 210, C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>S<sub>4</sub>, tempo de retenção de 28,99 minutos e abundância de 22,63%). Não foi possível sugerir a molécula referente ao pico de menor abundância relativa (2,44%), pois o índice de similaridade encontrado pelo

espectrômetro de massa é inferior a 90%, índice levado em conta para sugerir os outros compostos.

Figura 6: Perfis moleculares determinados pela espectrofotometria de massa do óleo obtido pela extração de clevenger das folhas in natura trituradas da *M. hirsuta* D.C



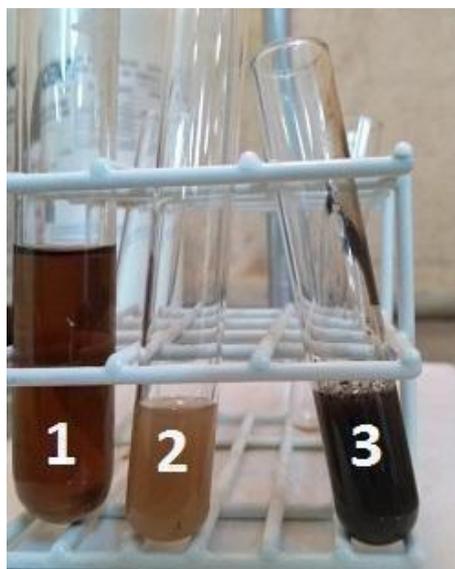
Fonte: Própria.

O ensaio de Lassaigne consiste em uma forma qualitativa de detectar a presença de compostos de enxofre através da formação de um precipitado. Esse teste foi realizado apenas com o óleo essencial obtido através da extração das folhas da *M. hirsuta* D.C seca e triturada, pois pontos presentes na cromatografia em camada delgada indicavam similaridades nos compostos de maior concentração. Outro fator que indicava a presença de compostos de enxofre foi o resultado da cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas, indicando a presença de diferentes compostos contendo enxofre.

Essa reação envolve inicialmente a adição de sódio metálico, responsável pela mineralização da amostra orgânica através da pirólise, facilitando a identificação de heteroátomos como o enxofre. Após a degradação completa do sódio metálico é adicionado água, com o intuito de interagir com o excesso de sódio, solubilizando esses

sais. O acetato de chumbo é adicionado a mistura com o intuito de reagir com os sulfetos, formando o Sulfeto de chumbo PbS, que possui uma coloração preta, podendo ser observado na forma de precipitado. Essa reação pode ser visualizada em diferente etapas na Figura 7, a solução 1 representa a solução de Lassaigne antes da filtração, a número 2 após a filtração e a 3 com a adição de acetato de chumbo.

Figura 7: Diferentes etapas da reação de Lassaigne, realizadas com o óleo essencial obtido da extração de clevenger das folhas secas e trituradas da *M. hirsuta* D.C



Fonte:própria.

### Conclusões

. Foi possível obter quantidades preparativas de óleo essencial das folhas *in natura* trituradas e secas trituradas da *Mansoa hirsuta* D.C, através da extração em triplicata por aparelho de clevenger por três horas. A cromatografia indicou o perfil cromatográfico diferente, em relação as concentrações dos compostos.

Através da análise do óleo obtido em quantidades preparativas por clevenger, avaliou-se o perfil cromatográfico e sugerindo e detectando alguns compostos voláteis de enxofre. Tendo como perspectiva futura estudos que avaliem o perfil farmacológico e trabalhem a purificação e isolamento destes compostos, para sugestão de picos não identificados e confirmação das sugestões feitas neste trabalho, com a realização de outros métodos físicos como infra vermelho ressonância magnética nuclear e outras injeções em espectrometria de massas em programações mais resolutivas.

### Agradecimentos

Ao Mestrado profissional em química.

### Referências

<sup>1</sup>Lucchese AM. Plantas da caatinga: Perfil Botânico, Fitoquímica e Atividade Biológica. Associação plantas do Nordeste, V.4. 2006.

<sup>2</sup>Rocha AD, Oliveira AB, Filho JDS, Lombardi JA, Braga FC. Antifungal constituents of *Clytostoma ranmetaceum* and *Mansoa hirsuta*. *Phytotherapy Research*, v.18, n. 6, pp. 463-



467. 2004.

<sup>3</sup> Braga FC, Wagner H, Lombardi J, Oliveira AB. 2000. Screening the Brazilian flora for anti-hypertensive plant species for in vitro angiotensin-I converting enzyme inhibiting activity. *Phytomedicine* 7: 245-250.

<sup>4</sup> Serafini, L. A.; Santos, A. C. A. dos; Touguinha, L. A.; Agostini, G.; Dalfovo, V. Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais. Coleção Biotecnologia. EDUCS, Caxias do Sul, 2002.

<sup>5</sup>Filho VC, Yunes RA. Estratégias para a obtenção de composto farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural, para otimização da atividade. *Química Nova*, v. 21, n. 1, pp. 99-105, 1998.

<sup>6</sup> Carvalho M. Braz FR. Novas técnicas de RMN e os deslocamentos químicos dos átomos de <sup>1</sup>H <sup>13</sup>C da isoflavona Duartrina. *Química Nova*, V. 16, p 89-94. Março, 2004.

<sup>7</sup> Carvalho Jr., P.M., Rodrigues, R.F.O., Sawaya, A.C.H.F., Marques. M.O.M., Shimizu, M.T. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia* Verbenacea D.C., *J. Ethnopharmacol.* 2004, 95, 297-301.

<sup>8</sup>Silva DM, Goulart HF, Freitas JD & Sant'Ana AEG. ESTUDO QUÍMICO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE MANSOA HIRSUTA DC. (BIGNONIACEAE). Instituto de Química e Biotecnologia, 2009. UFAL.

<sup>9</sup>Cerpa, MG; Mato, RB; Cocero, MJ. Modeling steam distillation of essential oils: Application to lavender in super oil. *AIChE Journal*, v. 54, p. 909-917, 2008.

<sup>10</sup>Cassel, E; Vargas, RMF. Experiments and Modeling of the *Cymbopogon winterianus* Essential Oil Extraction by Steam Distillation, *J. Mex. Chem. Soc.*, 55, p.57-60, 2006.

<sup>11</sup> Ehlert, P.A.D. et al. Tempo de hidrodestilação na extração de óleo essencial de sete espécies de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 79-80, 2006.

<sup>12</sup> Bizzo, H.R.; Hovell, A.M.C.; Rezende, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, v.32, n.3, p. 588-594, 2009.



- <sup>13</sup>Craveiro, A.A. et al. Óleos essenciais de plantas do nordeste. Fortaleza: UFC-Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, 1981. 210 p.
- <sup>14</sup> Masetto, M.A.M. et al. Rendimento e qualidade do óleo essencial de Pogostemon cablin Benth em diferentes períodos de secagem. 2007. In: IV Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais - IVSBOE (CD Simpósio). Anais... IV Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais. Disponível em:<[http://www.ivsboe.padtec.ufc.br/CDSimpósio/quimicaeatividadesbiologicasdosoleosessenciais/Resumo\\_MasettoMAM.pdf](http://www.ivsboe.padtec.ufc.br/CDSimpósio/quimicaeatividadesbiologicasdosoleosessenciais/Resumo_MasettoMAM.pdf)>. Acesso em: 29/08/2018
- <sup>15</sup>Oliveira, A.R.M.F. et al. Determinação do tempo de hidrodestilação e do horário de colheita no óleo essencial de menta. Horticultura Brasileira, v. 30, n.1, p.155-159, 2012.
- <sup>16</sup> Prins, C.L.; Lemos, C.S.; Freitas, S.P. Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 92-95. 2006.
- <sup>17</sup> Valmorbida, J. et al. Rendimento e composição química de óleos essenciais de *Mentha x piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes concentrações de potássio. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.8, p.56-61, 2006.
- <sup>18</sup> Hassel O.; Hvoslef, J.; The Structure of Bromine 1,4-Dioxanate, Acta Chemica Scandinavica, Vol 8, 873-873, 1954
- <sup>19</sup>Collins, C.H.; Braga,G.L.; Bonato,P.S. Fundamentos de Cromatografia. São Paulo: da Unicamp, 456p, 2006.
- <sup>20</sup> Ankri S, Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic, Microbes Infect. 1 (1999) 125e129.