**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ADILIO MACEDO SANTOS**

# Estudo da composição química do óleo essencial de *Aloysia gratissima* (Verbenaceae) em função da sazonalidade e seu potencial anticolinesterásico

**JEQUIÉ-BA**
**NOVEMBRO/2018**

**ADILIO MACEDO SANTOS**

# Estudo da composição química do óleo essencial de *Aloysia gratissima* (Verbenaceae) em função da sazonalidade e seu potencial anticolinesterásico.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química Analítica

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Rosane Moura Aguiar

**JEQUIÉ-BA**
**NOVEMBRO/2018**

TERMO DE APROVAÇÃO

**Adilio Macedo Santos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM **12/11/2018.**

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Rosane Moura Aguiar
(UFBA, Salvador-BA, 2008)
(Orientadora)

Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira
(UFMG, Belo Horizonte-MG, 2012)

Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Junior
(UFRJ, Rio de Janeiro-RJ, 2008)

Rua José Moreira Sobrinho, s/n – Jequiezinho
CEP: 45.208-091 - Jequié – Bahia
Telefone: (73) 3528-9630 Email: ppgquimica@uesb.edu.br

S237e Santos, Adilio Macedo.

Estudo da composição química do óleo essencial de Aloysia gratissima (Verbenaceae) em função da sazonalidade e seu potencial anticolinesterásico / Adilio Macedo Santos.- Jequié, 2018.

77f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, sob orientação da Prof.ª Dr.ª Rosane Moura Aguiar)

1.Aloysia gratíssima 2.Anticolinesterásico 3.Toxicidade I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II.Título

Rafaella Câncio Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié

“Obrigado meu Deus por me permitir tanto sem merecer nada. Mesmo sendo tão pequeno e insignificante, sei que sou especial aos Seus olhos, só tu sondas meu coração e sabe quem eu sou.”

## AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Rosane Moura Aguiar pela orientação não só nas atividades acadêmicas, mas também na vida. Obrigado por toda paciência, cuidado e dedicação durante todo esse tempo de inúmeras lutas. Sei o quanto dei trabalho, mas, mesmo diante dos problemas da vida, me dediquei o quanto pude, pois sei que não é “qualquer um” que encontra uma orientadora com tamanho profissionalismo e humildade. Melhor de tudo, grande “mãe” na vida. Obrigado Deus!

Ao Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira, meu orientador de TCC na Graduação em Química e Coordenador do Mestrado em Química Analítica (UESB) pelo apoio durante todo esse tempo e pelos momentos em que sempre se reunia com os mestrandos para algum incentivo. Professor exemplar dedicado que ama o que “faz”.

Aos demais professores do programa de Pós-graduação em Química pelo comprometimento em cada disciplina.

Aos meus colegas mestrandos que sempre compartilharam comigo angústias e alegrias durante o curso de todas as disciplinas.

Aos grandes amigos e companheiros deste tempo de mestrado: Sr. Antonio e Dona Ana, moradores do Povoado de Poço Dantas por tanto cuidado e dedicação com a espécie de *Aloysia gratissima* (Alfazema). Por terem cultivado e regado esta planta por tanto tempo e a cada período que fazíamos coleta, sempre nos recebia com o sorriso estampado no rosto e coração aberto. Ainda tínhamos um tempinho para as prosas e o velho “cafezinho”. Sou muito feliz por ter conhecido esse lugar e essas pessoas humildes e especiais.

A todo grupo do Laboratório de Óleos Essenciais pelo companheirismo durante a jornada, dentre eles, Jéssica Tâmara, Ivana e Adonias.

Ao grande amigo mestrando em Química Analítica pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Romário Santana, pela parceria e instruções no Laboratório de Farmacotécnica durante a realização de atividade antifúngica.

Agradeço também aos membros da Universidade Estadual de Feira de Santana em nome do Prof. Dr. Clayton Queiroz Alves e suas orientandas: Danielle Figuerêdo da Silva (Doutoranda em Recursos Genéticos Vegetais) e Verena Alves da Silva (Graduanda em Licenciatura em Ciências Biológicas) pela parceria para a realização da atividade anticolinesterástica.

Ao amigo, estudante de Farmácia e IC do laboratório de óleos essenciais, Villisaimon por toda paciência e contribuição ao longo de toda pesquisa.

Agradeço à farmacêutica, colega e Mestranda em Química Analítica, Maria da Luz Barreto, por tantos momentos de estudos e diversões nas viagens. Aprendi muito com você! Principalmente a lutar pelo que se sonha.

À companheira de guerra e mestranda em Química Analítica, Marluce, por “quebrar meus galhos” quando tinha algum probleminha, ela dava suporte. Obrigado minha coleguinha!

Muito obrigado! Grande amigo Luan, graduando do curso de Farmácia e IC do laboratório de óleos essenciais pelo grande companheirismo durante a atividade de toxicidade com *Artemia salina*. Não tenho como agradecer sua dedicação e ajuda.

Grande amigo, irmão e professor, Rafael Pereira, muito obrigado mais uma vez por fazer parte de mais uma etapa e obrigado em especial pelas análises de todas as amostras de óleos essências no Laboratório de cromatrografia (UESB) e por despertado em mim o interesse pela área de Óleos Essenciais.

Agradeço imensamente à companheira desde a graduação e minha ex-monitora de Química Orgânica, Carla Larissa Meira, por tantos ensinamentos na graduação e pós-graduação e suportar minhas dúvidas...kkkk

Agradeço à minha grande irmã, professora e farmacêutica Rosângela Pereira, por tudo! Por estudarmos tanto juntos e por me “aturar” kkk. Sei que fui muito chato, estudando e como amigo, mas você me ajudou a superar problemas acadêmicos e problemas diários. Obrigado amiga!

Agradeço a Juliana Lago por todo suporte e ajuda nas análises de cromatrogramas. Obrigado pela paciência! Sei que abusei dos seus ensinamentos.

Agradeço ao amigo Adonias Oliveira pelo apoio e ensinamentos com na execução e análise do programa CG-FID durante alguns dias no Laboratório de Catálise.

Aos professores de graduação e pós-graduação em Química pelas palavras de incentivo durante toda essa jornada, em especial aos professores Doutores: Sulene Alves, Vanderlúcia Fonseca, Marcos Bezerra, Suzimone Correia, Cleber Galvão, Valfredo Lemos, Renê Giampedro e Luiz Augusto Gesteira e aos professores Mestres: Alcione Torres e Siméia Cerqueira.

À minha filhinha Gabrielly Macedo (Gaby) por tanto amor que trouxe em minha vida e força para nunca desistir dos meus sonhos e sua mãe, Marizélia Brito pelo apoio e incentivo.

Aos meus pais, Autelino e Lourdes por serem sempre os grandes incentivadores de todas as minhas vitórias e por me darem força mesmo diante de algumas derrotas.

Aos meus irmãos Ananias Neto e Lucineide Rodrigues por sempre acreditarem em minha capacidade.

A toda minha família pelas contribuições, seja por admiração ou palavras incentivadoras.

Aos companheiros de trabalho da Polícia Militar da Bahia por torcerem tanto por minha vitória e pelas contribuições em minhas atividades, em especial: CAP PM Isahias, CAP PM Poliana, CAP PM Sheilla Kelly Ravane, SGT BM Manoela, CB PM Vidal, CB PM Elaine, CB PM Vilma Vieira, SD PM Andrade e SD PM Joilton.

A todos os meus amigos pela força e acreditarem em tudo que eu faço.

Aos amigos muito mais que especiais de minha vida, pessoas em que eu sempre contei e que nos momentos de maiores dificuldades sempre desabafei os meus problemas. Obrigado! (Dete, Raimunda, Luzia, Beca, Rosa, Ângela Almeida e Douglas).

A todos os outros conhecidos e admiradores que sempre estão acompanhando as minhas lutas do cotidiano. Muito obrigado a todos.

“Quem já passou por esta vida e não viveu, pode ser mais, mas sabe menos do que eu, porque a vida só se dá pra quem se deu, pra quem amou, pra quem chorou, pra quem sofreu.”

Vinícius de Moraes

# LISTA DE FIGURAS


| | | Pág. |
|---|---|---|
| **FIGURA 01**: | Esquema resumido da rota do mevalonato, biossíntese de mono e sesquiterpenos | 25 |
| **FIGURA 02:** | Formação do Cátion α-terpenílico | 26 |
| **FIGURA 03:** | *Aloysia gratissima* (Verbenaceae) | 27 |
| **FIGURA 04:** | Exsicata da *Aloysia gratissima* (Verbenaceae) | 30 |
| **FIGURA 05**: | Aparelho de hidrodestilação tipo Clevenger | 30 |
| **FIGURA 06:** | CG-EM - Laboratório de cromatrografia (UESB) | 31 |
| **FIGURA 07:** | CG-FID- Laboratório de Catálise (UESB) | 32 |
| **FIGURA 08:** | Estrutura do padrão interno Nerol | 33 |
| **FIGURA 09:** | Percentuais das classes dos terpenos obtidos de OE de *A. gratissima*. | 40 |
| **FIGURA 10:** | Rendimento de OE's de *Aloysia gratissima* | 47 |
| **FIGURA 11:** | Possíveis rotas biossintéticas de monoterpenos e sesquiterpenos presentes em OEAg | 48 |
| **FIGURA 12:** | Síntese e hidrólise da ACh | 53 |
| **FIGURA 13:** | Formação do ânion amarelo do 5-tio-2-nitrobenzoato resultado da reação entre a tiocolina e o íon 5,5,'-ditiobis-2-nitrobenzoato | 54 |
| **FIGURA 14:** | Teste de atividade anticolinesterástica. | 55 |
| **FIGURA 15:**. | Gráfico com percentual de inibição de OEAg para atividade anticolinesterástica | 56 |
| **FIGURA 16:** | Aquário com náuplios de Artemias salinas para teste de toxicidade | 59 |
| **FIGURA 17:** | Concentrações de amostras de OEAg para teste de toxicidade | 60 |

# LISTA DE TABELAS


| | | Pág. |
|---|---|---|
| **TABELA 01:** | Constituintes químicos presentes em OEAg (2015-2017). | 36 |
| **TABELA 02:** | Dados estatísticos dos constituintes marjoritários de *Aloysia gratissima*. | 41 |
| **TABELA 03:** | Dados do CG-DIC (Nov/17) | 43 |
| **TABELA 04:** | Dados do CG-DIC (Jun/17) | 44 |
| **TABELA 05:** | Dados do CG-DIC (Ago/17) | 46 |

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AcetilCoA:** Acetilcoezima

**ACh:** Acetilcolina

**AChE:** Acetilcolinesterase

**ABR/16:** Abril de 2016

**ABS**: Absorbâncias

**AGO/16:** Agosto de 2016

**AGO/17:** Agosto de 2017

**CG-EM:** Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

**CG-DIC:** Cromatografia gasosa com Detector por Ionização de Chama

**DA**: Doença de Alzheimer

**DNA:** Ácido Dexossiribonucléico

**DNTB:** Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)

**DMAPP:** Dimetilalildifosfato

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**$DL_{50}$:** Dose letal de 50%

**eV: E**létrons volts

**EMBRAPA:** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

**EXT:** Extração

**FF:** Folhas Frescas

**FPP:** Farnesil difosfato

**GPP:** Geranil difosfato

**ºC:** Graus celsius

**HUESB:** Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

**Hz:** Hertz

**IAChE:** Inibidores da acetilcolinesterase

**$IK_{(BIB)}$:** Índice de Kovats da Biblioteca

**$IK_{(LIT)}$:** Índice de Kovats da Literatura

**IP:** Média de Índice Pulviométrico

**IPP:** Isopentil difosfato

**JUN/17:** Junho de 2017

**LPP:** Linalil pirofosfato

**M/Z:** Razão entre massa e carga de um íon

**MAI/17:** Maio de 2017

**m/m:** massa/massa

**MMáx:** Média T °C Máxima

**MMin:** Média T °C Mínima

**m:** Metro

**MEP:** Metileritrinol Fosfato

**µg:** Micrograma

**µL:** Microlitro

**µm:** Micrometro

**mm**: Milímetro

**$mL.min^{-1}$:** Mililitro por minuto

**Min:** Minutos

**MIP:** Média de índice Pulviométrico

**MO:** Monoterpenos Oxigenados

**MH:** Monoterpenos Hidrocarbônicos

**MVA:** Mevalonato

**NOV/16:** Novembro de 2016

**NPP:** Neril Pirofosfato

**RRF**: Relative Response Factor (Fator de Resposta Relativa)

**SO:** Sesquiterpenos Oxigenados

**SH:** Sesquiterpenos Hidrocarbônicos

**SNC:** Sistema Nervoso Central

**SNP:** Sistema Nervoso Periférico

**OE:** Óleo Essencial

**OE's:** Óleos Essenciais

**OEAg:** Óleos Essenciais da *A. gratissima*

**OUT/15:** Outubro de 2015

**OUT/16:** Outubro de 2016

**PDA:** Potato Glicose Agar

**PI:** Padrão interno

**ppm:** Parte por milhão

***m/z*:** Razão massa/carga

**TIC:** cromatrograma de íons totais (Do inglês: total ion chromatogram)

**Tr:** Tempo de Retenção

# Estudo da composição química do óleo essencial de *Aloysia gratissima* (Verbenaceae) em função da sazonalidade e seu potencial anticolinesterásico.

Autor: Adilio Macedo Santos

Orientadora: Profª Drª Rosane Moura Aguiar

**Resumo:** Esta dissertação trata sobre o estudo da composição química e do potencial anticolinesterásico dos óleos essenciais de folhas de *Aloysia gratissima* (Verbenaceae), espécie de planta medicinal conhecida por Alfazema, em função da sazonalidade. A planta medicinal em estudo foi cultivada e coletada no povoado de Poço Dantas – Jequié – BA. Foram realizadas oito coletas, nos meses de Out/15, Abr/16, Ago/16, Out/16, Nov/16, Mai/17, Jun/17 e Ago/17. Os constituintes químicos dos OE's foram obtidos por hidrodestilação em apareho tipo Clevenger, a cada mês de coleta e armazenados em freezer, até o momento da análise. A identificação dos constituintes químicos foi realizada por CG-EM e a quantificação por CG-DIC. Foram identificados 26 constituintes, sendo eles monoterpenos e sesquiterpenos. Os constituintes majoritários para todos os meses foram: β-pineno, trans-pinocanfona, acetato de trans-pinocarvil e guaiol. O OE de Out/16 foi testado quanto a potencial anticolinesterásico, apresentando 85% de percentual de inibição, valor considerado significativo, quando comparado com o padrão Eserina com o percentual de inibição de 95%. Na avaliação de toxicidade frente ao micrucrustacéo *Artemia salina* foram utilizados os OE's de Mai/17 e Jun/17, nas concentrações de 825,6; 453,1; 226,6; 90,6; 45,3; 18,1 e 9,1 $\mu g.mL^{-1}$. Foi calculado o $DL_{50}$ para as amostras, sendo 49,88 ppm e 50,44 ppm, respectivamente, caracterizando-as como tóxicas e um potencial anti-Trypanossoma cruzi foi indicativo para o teste. A presença de mono e sesquiterpenos nos OEAg contribuíram diretamente na expressão dos resultados nos testes de bioatividade, podendo ser reflexo da constituição majoritária ou do sinergismo entre os componentes do OE.

**Palavras chave:** *Aloysia gratissima*, anticolinesterásico e toxicidade.

# Estudo da composição química do óleo essencial de *Aloysia gratissima* (Verbenaceae) em função da sazonalidade e seu potencial anticolinesterásico.

Author: Adilio Macedo Santos

Adivisor: Profª Drª Rosane Moura Aguiar

**ABSTRACT:** This dissertation deals with the study of the chemical composition and anticholinesterase potential of leaf essential oils of Aloysia gratissima (Verbenaceae), a medicinal plant species known as Lavender, due to seasonality. The medicinal plant under study was cultivated and collected in the village of Poço Dantas - Jequié - BA. Eight collections were carried out in the months of Oct / 15, Apr / 16, Aug / 16, Oct / 16, Nov / 16, May / 17, Jun / 17 and Aug / 17. The chemical constituents of the OE's were obtained by hydrodistillation in a Clevenger type apparatus, each month of collection and stored in a freezer, until the moment of analysis. Identification of chemical constituents was performed by GC-MS and quantification by CG-DIC. Twenty-six constituents were identified, being monoterpenes and sesquiterpenes. The major constituents for all months were: β-pinene, trans-pinocanfone, trans-pinocarbon acetate and guaiol. The Out / 16 OE was tested for anticholinesterase potential, presenting 85% inhibition percentage, considered as significant when compared to the Eserine standard with 95% inhibition percentage. In the evaluation of toxicity against the Artemia salina micrucrustacé, the EOs of Mai / 17 and Jun / 17, in the concentrations of 825.6; 453.1; 226.6; 90.6; 45.3; 18.1 and 9.1 µg.mL -1. The LD50 was calculated for the samples, being 49.88 ppm and 50.44 ppm, respectively, characterizing them as toxic and an anti-Trypanosoma cruzi potential was indicative for the test. The presence of mono- and sesquiterpenes in OESg directly contributed to the expression of the results in the bioactivity tests, and may be a reflection of the majority or synergism between the OE components.

**Keywords:** Aloysia gratissima, anticholinesterase and toxicity

# SUMÁRIO


| | | Pág. |
|---|---|---|
| **APRESENTAÇÃO GERAL** | | 18 |
| **CAPÍTULO 01** | | 20 |
| **Estudo Sazonal da composição química dos óleos essenciais da *Aloysia gratissima* (VERBENACEAE).** | | 21 |
| **1** | **LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO** | 21 |
| **1.1** | **Óleos Essenciais: Composição Química e Sazonalidade** | 21 |
| **1.2** | **Biossíntese de Óleos Essenciais** | 23 |
| **1.3** | ***Aloysia gratíssima* (Verbenaceae)** | 26 |
| **2** | **OBJETIVOS** | 28 |
| **2.1** | **Objetivo Geral** | 28 |
| **2.2** | **Objetivos Específicos** | 29 |
| **3** | **PARTE EXPERIMENTAL** | 29 |
| 3.1 | **Material Vegetal** | 29 |
| 3.2 | **Obtenção e Análise do Óleo Essencial** | 30 |
| **3.3** | **Levantamento de Dados Metereológicos** | 35 |
| **4** | **RESULTADOS E DISCUSSÃO** | 35 |
| **5** | **CONCLUSÃO** | 49 |
| | **CAPÍTULO 02** | 51 |
| | **Testes Biológicos com Óleos Essenciais de *A. gratissima*** | 52 |
| **2** | **Avaliação do Potencial Anticolinesterástico** | 52 |
| **3** | **Referencial Teórico** | 52 |
| **4** | **Resultados e Discussão** | 56 |
| **5** | **AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE COM MICROCRUSTÁCEO ARTEMIA SALINA** | 57 |
| **5.1** | **Referencial Teórico** | 57 |
| **5.2** | **Parte Experimental** | 59 |
| **5.3** | **Resultados e Discussão** | 60 |
| **6** | **CONCLUSÃO** | 61 |
| **CONCLUSÕES GERAIS** | | 63 |
| **REFERÊNCIAS** | | 64 |

**APÊNDICES - DADOS COMPLEMENTARES** 73
**Ãpendice A** 74
**Ãpendice B** 74
**Ãpendice C** 74
**Ãpendice D** 75
**Ãpendice E** 75
**Ãpendice F** 75
**Ãpendice G** 76
**Ãpendice H** 76
**Ãpendice I** 77
**Ãpendice J** 77
**Ãpendice L** 78
**Ãpendice M** 78

# APRESENTAÇÃO GERAL

Através dos tempos a humanidade tem utilizado os recursos da natureza para a produção de comestíveis, abrigo, roupas, meio de transportes, fertilizantes, fragrâncias e medicamentos. As plantas têm sido base do sofisticado sistema da medicina tradicional que existem há milhares de anos. Os primeiros registros medicinais escritos em comprimidos de argila em cuneiforme são da Mesopotâmia e são dotados de aproximadamente 2.100 a.C.; Entre as substâncias utilizadas estão óleos de espécies *Cedrus* (Cedro) e *Cupressus semprevirens* (cipreste), *Glicyrrhiza glabra* (alcaçuz), *Commiphora species* (mirra) e *Papaver somniferum* (suco de papoula), todas as quais ainda estão em uso nos dias de hoje, para tratamento de distúrbios que vão de tosse, resfriados à infecções parasitárias e inflamação (BORCHARDT, 2002).

A natureza tem sido fonte de agentes medicinais por milhares de anos e continua sendo uma abundante fonte de novos quimiotipos e farmacófaros. Com apenas 5-15% das cerca de 250.000 espécies de plantas superiores sistematicamente investigadas (CECHINEL FILHO & YUNES, 2014). O grande incremento do uso de plantas para fins medicinais, desde o final do século XX, tem renovado interesse pelo conhecimento das características das drogas delas originadas, incluindo sua morfologia, composição química, propriedades farmacológicas e controle de qualidade, especialmente quando se trata de plantas brasileiras (SIMÕES et al., 2010).

Recentemente, os estudos com plantas medicinais têm sido responsáveis por inúmeras e importantes descobertas; o desenvolvimento desta área de pesquisa deve-se a vários fatores, dos quais se destaca a participação de um número cada vez maior de profissionais. No entanto, resultados promissores dependem da inter-relação entre profissionais de diferentes áreas, que compõem o estudo das plantas medicinais, pois a continuidade de tais estudos de forma isolada perpetuará em falta de resultados, impedindo consequentemente o desenvolvimento de novos medicamentos (DI STASI, 1996).

A química de produtos naturais tem por objetivo imediato o esclarecimento e registro de constituintes resultantes de metabolismo secundário dos seres vivos,

através de seu isolamento e elucidação de suas estruturas moleculares. Embora compreenda assim, o estudo da composição química de animais e vegetais, é no campo da fitoquímica que se encontra o maior número de trabalhos publicados. A importância científica das pesquisas desenvolvidas nesta área se traduz pelos resultados obtidos com a consecução de seus objetivos mediatos (são conhecidos hoje milhares de compostos naturais), como pela aplicação imediata ou mediata destes trabalhos a outras áreas científicas correlatas (MATOS, 2009).

Dá-se o nome de metabolismo ao conjunto de reações químicas que, continuamente, estão ocorrendo em cada célula. A presença de enzimas específicas garante uma certa direção a essas reações, estabelecendo o que se denomina de rotas metabólicas. Os compostos químicos formados, degradados e transformados são chamados de metabólitos e as reações enzimáticas envolvidas, respectivamente, são designadas como anabólicas, catabólicas ou de biotransformação (SIMÕES, et al, 2010).

Os compostos resultantes desse metabolismo podem ser separados em dois grupos: os produtos de metabolismo primário que são os glicídios, protídeos e lipídios, e no segundo grupo os do metabolismo secundário, que são os compostos terpênicos, alcaloides, glicosídicos, flavonoides e vários outros. Os compostos do primeiro grupo são estudados, principalmente no âmbito da bioquímica e os últimos no âmbito do que se convencionou denominar química dos produtos naturais. (MATOS, 2009).

O presente trabalho objetivou avaliar a variação do teor e da composição química do OE de *A. gratissima* (Verbenaceae), no período compreendido entre outubro de 2015 à agosto de 2017, correlacionado as diferentes estações do ano e condições meteorológicas da região. A identificação e quantificação dos constituintes químicos presentes no OE, utilizando a técnica de quantificação pelo fator de resposta relativo a um padrão interno, por CG-EM e CG-DIC. Tal estudo, visou ainda, a avaliação do potencial anticolinesterásico e de toxicidade dos OEAg. Permitindo inferir sobre a potencialidade dos OE de plantas da região semiárida, como fonte de materiais bioativos.

# CAPÍTULO 01

# ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DA *ALOYSIA GRATISSIMA* (VERBENACEAE) EM FUNÇÃO DA SAZONALIDADE

## 1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

### 1.1 Óleos Essenciais: composição química e sazonalidade

O metabolismo secundário de plantas produz substâncias para defesa em resposta a um ataque patogênico ou para interagir com o meio. Os óleos essenciais são uma mistura de compostos líquidos oleosos voláteis, dotados de aroma forte e quase sempre agradável, existente em quase duas mil espécies de plantas, ditas aromáticas (RADUNZ et al, 2001). Flores, folhas, raízes, cascas e frutos são matéria prima para a produção de óleos essenciais, com grande aplicação para as indústrias cosmética, farmacêutica e alimentícia (SILVA, 2005).

Os óleos essenciais são constituídos principalmente por terpenóides e acrescidos de moléculas de classes de fenilpropanóides e funcionalizadas como: ácidos, álcoois, cetonas, ésteres cíclicos e compostos com nitrogênio e enxofre também foram identificados em OE (BELL; CHARLWOOD, 1980, Apud, CHECINEL FILHO & NUNES, 2014). Os terpenóides apresentam uma grande variabilidade estrutural, que são formados pela junção cabeça-cauda de unidades isoprênicas ($C_5$), estando predominante nos OE's como monoterpenos ($C_{10}$) e sesquiterpenos ($C_{-15}$) (FEHLBERG, 2011). Estes compostos conferem aos OE's uma gama de potenciais biológicos, apresentando ação anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral, antidiabética, antiulcerogênica, anticariogênica, hepatoprotetora, neuroprotetora, antiparasítica, analgésica e antioxidante (COSTA et al, 2017).

A biossíntese de óleos essenciais é influenciada por fatores climáticos como fotoperíodo, temperatura, umidade, precipitação e intensidade de radiação solar, que podem determinar a época ideal de colheita ou o local de cultivo, onde se poderá obter a maior quantidade de OE e do princípio ativo desejado. (PAULUS et al, 2013, Apud, TAVEIRA et al, 2003).

A influência da sazonalidade na biossíntese de metabólitos secundários em plantas medicinais foi indicada em pesquisas, como por exemplo, as realizadas por Paulus (2013), Brant (2009) e Carvalho & Casali (1999). Onde observaram grandes variações na produção de OE em relação a alguns fatores climáticos, que influenciam inteiramente os constituintes químicos presentes e seus teores.

A precipitação é um dos elementos meteorológicos que exerce maior influência sobre as condições ambientais. Além do efeito direto sobre o balanço hídrico, exerce influência indiretamente sobre outras variáveis como: temperatura do ar e do solo, umidade relativa do ar e a radiação solar, que em conjunto, atuam como fatores básicos para o desenvolvimento das plantas. (EMBRAPA, 2002). De acordo com Paulus (2013), os dados meteorológicos como precipitação, temperatura, umidade relativa do ar e radiação solar influenciam diretamente na sazonalidade e desenvolvimento das plantas.

A diminuição em algum componente biologicamente ativo com relação à variação sazonal, como os fenólicos, é acompanhada pelo aumento de outros, por exemplo, ácidos diterpênicos. Deste modo, pode-se esperar que algumas atividades biológicas, relacionadas a estes compostos, como antibacteriana e antifúngica, por exemplo, sejam variáveis em diferentes estações do ano (BANKOVA et al, 1998).

De acordo com Pinto (2007), existem mudanças nas características anatômicas e fisiológicas dos vegetais e também na produção de OE e isso é devido a influência de diversas condições que têm sido evidenciadas, tais como: fotoperíodo, radiação, temperatura, estesse hídrico, índice pluviométrico e outros. Esses fatores podem influenciar também na quantidade do princípio ativo desejado. Para Lee (2000), relata que plantas mantidas sob maior irradiância, apresentam a epiderme de superfícies mais expressas. Havendo diferenças na espressura das folhas devido a maior produção de metabólitos primários e secundários. Pinto (2007), plantas submetidas a um maior nível de irradiância apresentam aumento na produção de óleos essenciais.

A variação sazonal da composição química do OE de folhas frescas de *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd, cultivadas no sul do Brasil, foi analisada por CG-EM, bem como suas atividades analgésica e antimicrobiana. O rendimento do OE variou de 0,17% a 0,26%, com a quantidade máxima no inverno e a mínima na

primavera. Os resultados obtidos a partir da análise de componentes principais (PCA) revelaram a existência de alta variabilidade química nas diferentes estações do ano (GAZIM et al, 2010).

Em seus estudos sobre a importância da época da colheita, Ricciardi et. al. (2000), mostra que, outono e primavera são épocas em que os OE's sofrem variações apresentando diversas cetonas monoterpênicas e hidrocarbonetos sesquiterpenos. Também foi realizado por Nunes (2009), um estudo com constituintes químicos da Própolis Vermelha de Pernambuco e bioatividade em *Artemia salina* em função da variação sazonal. A pesquisa foi realizada nos meses de fevereiro, junho e outubro de 2006, sendo identificados por CG-EM monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, aldeídos, cetonas e n-alcanos. Os constituintes majoritários foram o trans-anetol, α-copaeno e o metil cis-isoeugenol.

A marcante variabilidade interanual da pluviometria associada aos baixos índices totais anuais pluviométricos, sobre a região nordeste do Brasil, é um dos principais fatores para a ocorrência dos eventos de "secas" sobre a região, as quais são caracterizadas por acentuada redução do total pluviométrico sazonal durante o período de fevereiro a maio. Em Poço Dantas, povoado do município de Jequié - BA, o verão é longo, quente e de céu quase encoberto; o inverno é curto, agradável e úmido . Ao longo do ano, em geral a temperatura varia de 17 °*C* a 32 °*C* e raramente é inferior a 15 °*C* ou superior a 35 °*C.* A *estação quente* permanece por *5,3 meses*, de 29 *de outubro* a 6 *de abril*, com temperatura máxima média diária acima de *31 °C*. A *estação amena* permanece por 2,5 *meses*, de 8 *de junho* a 25 *de agosto*, com temperatura máxima diária em média abaixo de 27 °*C* (Disponível em: Weather Spark).

## 1.2 Biossíntese de Óleos Essenciais

A biossíntese de produtos naturais de plantas constitui-se em uma das bases da biologia sistêmica, nos quais intermediários biossintéticos podem ser inseridos dentro de uma rede metabólica com processos intracelulares, coordenados por enzimas altamente organizadas. O conhecimento dos processos mediados por

enzimas, os quais ocorrem em tipos de células especializadas, constitui-se no caminho para entender processos regulatórios envolvidos na formação do complexo perfil de produtos naturais em plantas (KUTCHAN, 2005).

Os terpenóides compreendem o maior grupo de produtos naturais, com mais de 35.000 membros conhecidos, muitos outros produtos naturais contêm terpenóides em suas moléculas, em combinação com esqueletos de carbono derivados de outras fontes, como as vias acetato e shikimato. Estuturalmente, terpeno é uma classe de metabólitos secundários, derivados de unidades do isopreno (C5) que são hemiterpenos, monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40). Existem ao menos duas vias envolvidas na biossíntese de terpenos: a rota do mevalonato, que opera no citoplasma e mitocôndrias e a rota do 5-fosfato de 1-desoxi-D-xilulose (DXP), que opera no plastídio. As duas rotas convergem para a produção dos isômeros do isopreno, o difosfato de isopentinila (IPP) e o difosfato de dimetilalila (DMAPP), os quais são as unidades isoprênicas bioquimicamente ativas na biossíntese dos terpenos (BARROS et al, 2009; DEWICK, 2009).

Na rota do mevalonato (**FIGURA 1**), os isômeros isoprênicos são originados do ácido mevalônico (MVA). Para tanto, duas unidades de acetil-CoA combinam-se por reações do tipo condensação de Claisen e uma terceira é adicionada por condensação aldólicas, produzindo 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA. Sucessivas reações de redução e descarboxilação, catalisadas por enzimas, convertem o 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA ao intermediário MVA. Este intermediário é pirofosforilado, descarboxilado e desidratado para formar o isopentenil pirofosfato (IPP), unidade básica da formação dos terpenos. A partir de condensação de molécula do IPP e seu isômero tautômero, o dimetilalil difosfato (DMAPP), chega-se à uma molécula de 10 carbonos, a difosfato de geranila (GPP), que dá origem aos monoterpenos.

Os sesquiterpenos são formados a partir de três unidades C5 e sintetizados através da via do mevalonato. A adição de outra unidade IPP ao GPP leva ao percussor fundamental dos sesquiterpenos, o difosfato de farnesila (FPP). O FPP pode dar origem a vários sesquiterpenos lineares e cíclicos (BARROS et al, 2009; SIMÕES et al, 2007).

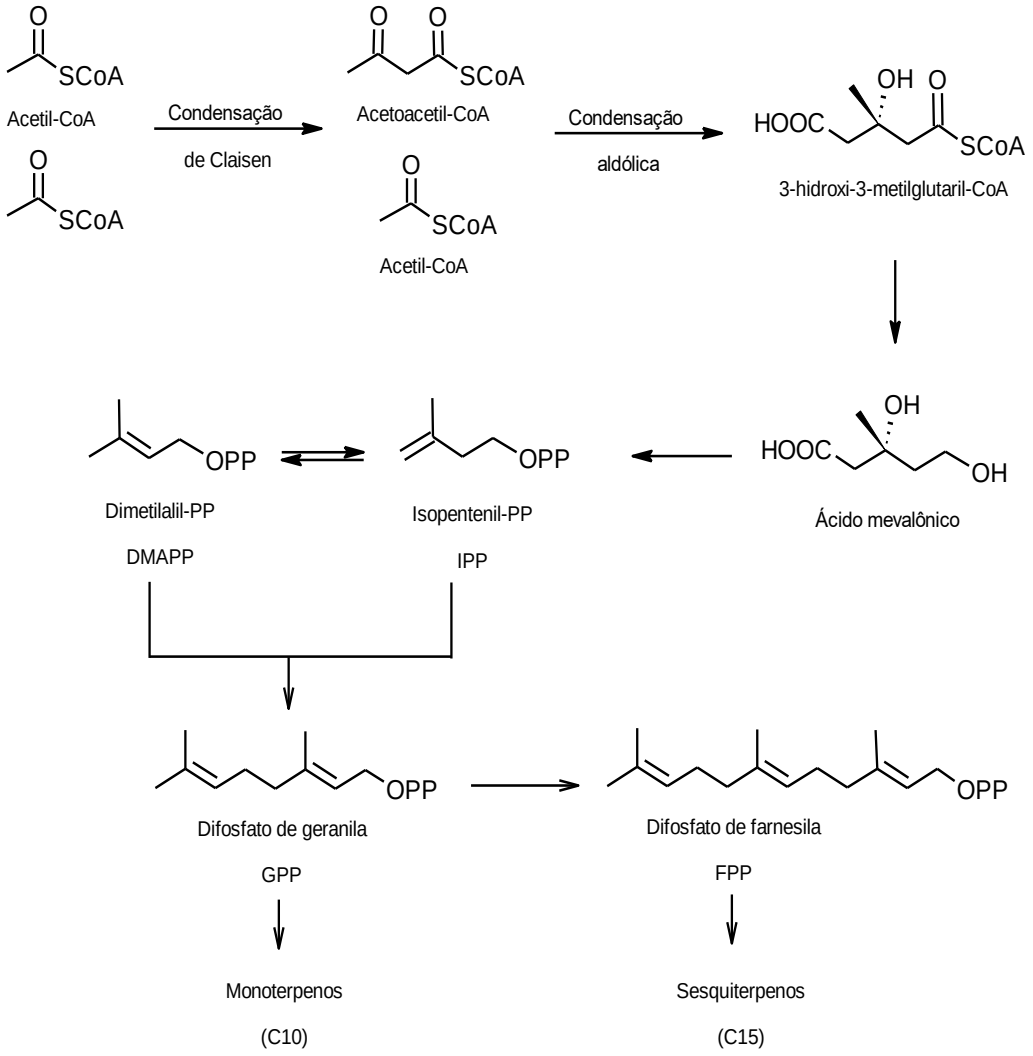



**Figura 01.** Esquema resumido da rota do mevalonato, biossintesse de mono e sesquiterpenos. (DEWICK, 2009).

O GPP sofre eventos químicos como, isomerização e perda de prótons, levando a duas unidades conhecidas como linalil pirofosfato (LPP) e a neril pirofosfato (NPP) (**FIGURA 2**). Estes três intermediários levam a obtenção de uma variedade de substâncias conhecidas como monoterpenos lineares. Os intermediários LPP e NPP apresentam uma estereoquímica favorável a ciclização, sendo preferenciais na rota de formação do cátion $\alpha$-terpinílico. Este cátion, subsequentemente, sofre reações de ciclização, oxidação, perda de prótons, adição de água e rearranjo de Wagner-Meerwein, levam a uma variedade de sistemas mono e bicíclicos (DEWICK, 2009).

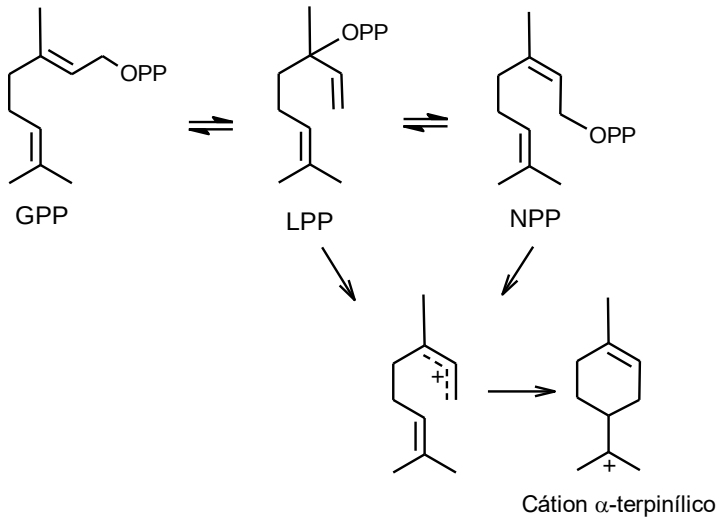



**Figura 02.** Formação do Cátion α-terpenílico. (DEWICK, 2009).

## 1.3 *Aloysia gratissima* (Verbernaceae)

Verbenaceae é uma família com cerca de 100 gêneros e aproximadamente 2600 espécies de ervas, arbustos ou pequenas árvores as quais estão distribuídas principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Espécies desta família têm despertado interesse tanto pelo potencial biológico quanto pelo uso da medicina tradicional. (VANDRESEN et al, 2009, Apud, BARROSO, 1978). No Brasil, encontram-se 47 gêneros distribuídos em 407 espécies nos diferentes hábitos, desde ervas perenes, arbustos até subarbustos (SALIMENA et al, 2013).

No levantamento etnobotânico feito por Santos et. al. (2015), da família *Verbenaceae* foram registrados um total de 85 publicações, indicando 55 espécies distribuídas em oito gêneros, sendo que 36 foram identificadas a nível de espécie, 19 somente a nível de gênero. Este estudo foi realizado com base num levantamento bibliográfico feito de 2000 á 2012 referente as plantas desta família com potencial medicinal.

*Aloysia gratissima* (GILLIES & HOOK.) Tronc.) (**FIGURA 3**) é muito difundida na medicina popular sul-americana, é uma planta aromática, rica em óleos essenciais, nativa da América do Sul, pertencente à família *Verbenaceae*. Ocorre no

Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai e apresenta uma grande variedade de nomes populares, sendo alfazema-do-Brasil, erva-de-nossa-senhora, erva santa e garupá. Observa-se o relato de seu uso em enfermidades do trato respiratório como gripes, tosses, bronquites e para dores provocadas por cólicas e cefaleias (SOUZA et al 2007; RICCIARDI et al, 2000).

Lorenzi e Matos (2002) descreve a classificação para a espécie de *A. gratissima* como: Reino: *plantae*, Divisão: *Magnoliophyta*, Classe: *Magnoliopsida*, Ordem: *Lamiales*, Familia: *Verbenaceae* Jaume Saint-Hilare, Gênero: *Aloysia*, Sinomini: *Lippia*, Espécie: *Aloysia gratissima* e sinominia: *Lippia lycioides* (Cham.).

**Figura 03.** *Aloysia gratissima* (Verbenaceae). Fonte: Dolores Fernandez

Os óleos essenciais da *Aloysia gratissima* pode ser obtido de diversas partes da planta, tais como: folhas, flores, frutos, cascaz e rozomas. Tais óleos apresentam propriedades farmacológicas, sendo eficazes contra infecções brônquicas e pulmonares, além de ação antimicrobiana (BIZZO et al, 2009; PINTO et al, 2007).

Estudos sobre os óleos essenciais de plantas do gênero *Aloysia* relatam a obtenção de alto percentual de rendimento do óleo, em relação a massa vegetal. Um interessante aspecto químico desses óleos é a grande diversidade de compostos encontrados. Contudo, diferenças podem existir, mesmo em plantas que são morfologicamente idênticas, caracterizando a existência de quimiotipos, ou a influência de condições climáticas ou geográficas, tais fatores podem ser utilizados como explicação das variações observadas. Como a composição química do óleo

essencial varia em decorrência de fatores externos pode determinar a época adequada para a extração, com maior rendimento do óleo e com maior percentual de um componente de interesse farmacológico (SOLER ET AL, 1986).

A análise da composição química do óleo essencial de *Aloysia triphylla* em função da sazonalidade apresentou grande variação no rendimento, sendo mais alto nos meses de junho a agosto, além de apresentar maiores variações nas concentrações dos constituintes majoritários, sendo: geranial (26,11-37,35%), neral (18,02 a 29,31%), limoneno (9,21 a 15,77%), nerolidol (2,68 a 24,34%) (PAULUS et al., 2013).

Estudos anteriores mostram que a composição química do óleo essencial de *A. gratissima* destaca-se pelo predomínio de terpenos em sua constituição química, porém apresenta pelo menos, dois quimiotipos nos componentes químicos majoritários. No Brasil é comum a variedade rica em isopinocanfona, limoneno e guaiol; no Uruguai tem-se sabineno, α-pineno, β-bisaboleno e copaenol (SANTOS et al, 2009; SOLER et al, 1986; TROVATI et al, 2009; MORAES et al, 2012).

Estudos sobre os OE de *A. gratissima*, cultivadas na Argentina, apontam o grande percentual de terpenos, com variações na composição química. Observa-se no trabalho de Bailac (1999), a identificação dos constituintes majoritários trans-verbenol (2,8%), beta-cariofileno (3,3%), óxido de cariofileno (11%) e cadinol (33%). Um estudo da variação sazonal realizado por Riciarddi (2006) apresenta variações para os constituintes: *β*-elemeno (traços a 35,7%); viridiflorol (0,9–33,6%); *β*-cariofileno (1,8–28%); *α*-tujona (6,8–17,5%); 10-*epi*-cubebol (0,1–13,4%).

Com o intuito de contribuir ainda mais com a pesquisa no Brasil, faz-se necessário o estudo da composição química do óleo essencial de *A. gratissima*, em função da sazonalidade, como fonte de informações sobre plantas de ocorrência na região semiárida do estado da Bahia.

# 2 OBJETIVOS

## 2.1 Objetivo geral

Estudar a composição química do óleo essencial das partes aéreas de *A. gratissima* (Verbenaceae), cultivada no município de Jequié-Ba, em função da sazonalidade, bem como avaliar seus potenciais: anticolinesterásico e de toxicidade.

### 2.2 Objetivos específicos

- Coletar e identificar um espécime de *A gratissima*, cultivada na região de Jequié – BA;
- Realizar coletas periódicas das partes aéreas de *A. gratissima;*
- Obter os óleos essenciais das partes aéreas da *A. gratissima,* por períodos, por hidrodestilação com aparelho tipo Clevenger;
- Identificar os constituintes químicos dos óleos essenciais das partes aéreas da *A. gratissima* por CG-EM;
- Quantificar os constituintes químicos presentes nos OE's através de CG-DIC, utilizando a técnica de quantificação por fatores de resposta relativa (RRF);
- Avaliar o potencial anticolinesterástico dos óleos essenciais das partes aéreas da *A. gratissima;*
- Avaliar o potencial de toxicidade dos óleos essenciais das partes aéreas da *A. gratissima,* pelo método bioensaio frente aos microcrustácio de *Artemia salina;*
- Correlacionar as variações na composição química dos OE's, as condições climáticas do período de estudo.

## 3 PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 Material vegetal

Para a realização dos experimentos foram utilizadas as partes aéreas de *A. gratissima* (Mill.), (*Verbenaceae*), provenientes de cultivo em Poço Dantas, povoado do município de Jequié, na região do Sudoeste da Bahia, Brasil. Foram realizadas oito coletas (outubro de 2015 a agosto de 2017). A espécie foi identificada pela botânica Profª Drª Guadalupe Edilma Lincona de Macedo, do Herbário da Universidade Estadual do sudoeste da Bahia (HUESB) (**FIGURA 04**), onde encontra-se depositada a exsicata do material vegetal sob o registro de nº 11677.

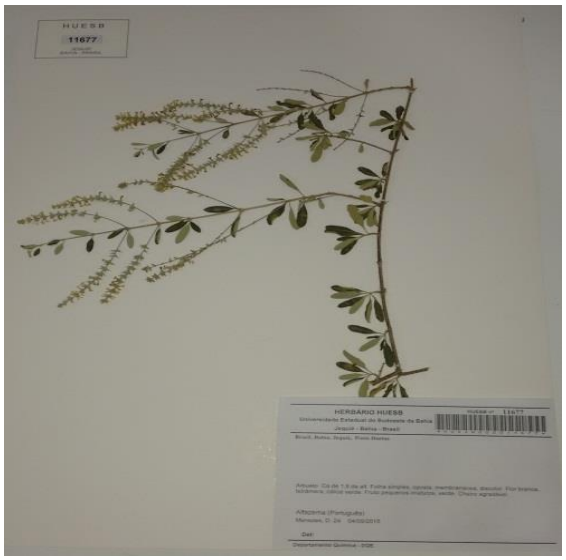



**Figura 04.** Exsicata da ***Aloysia gratissima*** (Verbenaceae), conhecida popularmente como (Alfazema). **Fonte**: Própria

## 3.2 Obtenção e análise do óleo essencial

O óleo essencial foi extraído a partir do material vegetal fresco, submetido à hidrodestilação em aparelho Clevenger por 2 h, após fervura, conforme a metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira (**FIGURA 05**). O rendimento das extrações foi calculado com base na relação entre a massa do OE e a massa do material vegetal expresso em porcentagem).

**Figura 05.** Aparelho de hidrodestilação tipo Clevenger. **Fonte**: Própria

A identificação dos constituintes dos OE's foi realizada através CG-EM, em um aparelho Shimadzu, modelo QP2010 **(FIGURA 06)**, instalado no laboratório de cromatografia da UESB Prof. Dr. Jailson Bittencourt, foram utilizadas as seguintes condições experimentais: coluna capilar DB-5 de 30 m x 0,25 mm diâmetro interno, com 0,25 µm de espessura de filme composto de dimetilpolisiloxano (95%) e fenila (5%), tem hélio como gás de arraste, com um fluxo de 1,8 $mL.min^{-1}$; temperatura do injetor de 220 °C; programa de aquecimento da coluna entre 40 °C a 240 °C, com razão de 3 $°C.min^{-1}$. A temperatura da interface foi de 240 °C, fonte de íons, 220 °C (70 eV) e a faixa de varredura de massas de 40 a 400 u.m.a. A identificação foi feita por similaridade com os dados da biblioteca NIST14, residente no cromatógrafo CG-EM utilizado.

**Figura 06.** CG-EM - Laboratório de cromatrografia (UESB). **Fonte**: Própria

Os componentes do óleo essencial foram identificados com base no índice de retenção, determinados através da utilização de uma curva de calibração de uma série homóloga de n-alcanos (C8-C24), injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras e nos modelos de fragmentação dos espectros de massas, sendo ambos comparados com dados da literatura (Adams, 2007 e NIST 14).

**Figura 07.** CG-FID- Laboratório de Catálise (UESB). **Fonte**: Própria

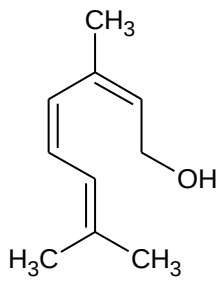
Para a quantificação dos constituintes do OE foi utilizada a técnica de quantificação por fatores de resposta relativa (RRF), realizada por meio de análises por cromatografia gasosa. Utilizou-se o equipamento Varian, modelo CP 3800, com detector de ionização de chama (CG-FID) **(FIGURA 07)**, com coluna capilar DBS 0,25 mm de diâmetro interno, 30 m de comprimento e 25 µm de filme líquido THK. Amostras de óleo essencial de *A. gratissima:* Nov (8,87 µg), Jun/17(17,74 µg), Ago/17(13,31 µg) e o Nerol (PI) foram pesadas em balança analítica de precisão e diluídas em 1 mL de tolueno. Após preparadas, 1 µL foi injetado em razão de split 1:10, com temperatura inicial: 40 ºC / 2 min, rampa de aquecimento: 3 ºC.min$^{-1}$, temperatura final: 240 ºC / 5 min. Tendo como gás de araste o nitrogênio em uma vazão de 3 mL.min$^{-1}$, e temperatura de injetor de 220 ºC, a temperatura de DIC de 240 ºC, a pressão na coluna de 14 psi. Gás de make-up: ar sintético, nitrogênio e hidrogênio.

Segundo Cachet et. al. (2016), este método permite a determinação quantitativa de substâncias voláteis por detecção de ionização em chama. Os fatores de resposta relativa (RRF) podem ser previstos a partir da fórmula do composto, podendo ser aplicada a compostos que contenham C, N, S ,F, Cl, Br, I, Si. Para isso, a fórmula molecular deve ser conhecida e também o número de anéis de benzeno dos analitos.

De acordo com Tissot et. al. (2012), o detector de ionização de chama, baseia-se na combustão de analitos, havendo uma boa correlação entre fatores de resposta relativos (RRFs) e as entalpias de combustão, assim, os RRFs podem ser

simulados para todos os constituintes voláteis. Esta técnica além de ser considerada em outros trabalhos como satisfatória, evidencia uma alta precisão se os constituintes quantificados apresentarem (RRFs=1).

Para a aplicação desta técnica foi utilizado um padrão interno que é uma maneira eficiente e usual para quantificar compostos, onde a substância volátil é injetada junto com o padrão interno e suas respostas são corrigidas usando os RRFs previstos conforme descrito por Cachet et. al. (2016). Neste caso, foi utilizado o nerol **(FIGURA 08)**, que é um terpeno oxidado conforme descrito por Teixeira, (2018), Segundo o mesmo, ele possui as mesmas características da maioria dos compostos presentes nos OEAg, sendo o mesmo ausente da amostra aumentando assim o grau de confiabilidade nos resultados obtidos Todos os RRFs foram medidos experimentalmente de acordo ao método descrito por Tissot et. al. (2012).




Nerol

**Figura 08:** Estrutura do padrão interno Nerol. **Fonte:** Própria

Os cálculos de RRFs foram realizados numa planilha do excel conforme descrito na literatura por Cachet et. al. (2016), onde foram considerados as respectivas áreas, fórmulas moleculares e as massas das amostras de óleos em estudo com e sem correções de cada constituinte químico dos os períodos citados.

Ainda segundo Tissot et. al. (2012) os fatores de respostas (RRFs) previstos foram obtidos pela equação na forma simplificada, indicada para amostras de óleos.

**Equação 01**

$RRF_i^{Prev} = 10^3(MW_i/MW_{PI})(-61.5 + 88.8nC + 18.7nH - 41.3nO + 6.4nN + 64.0nS + 127\ nBenz)-1$

Sendo de acordo com a equação 01:

**$n_C$, $n_H$, $n_O$**, etc. = número de átomos de carbono, hidrogênio, oxigênio, etc contidos no composto; nBenz= número de anéis de benzeno; $MW_i$ = massas moleculares do analito; $MW_{PI}$= padrão interno.

Ainda segundo descrito na mesma literatura, quando adiciona-se um padrão interno em uma amostra real, a quantificação é obtida pela seguinte equação:

**Equação 02**

$m_1 = \boldsymbol{A1\ x\ mp\ xRRF\ /\ Ap}$

Sendo:

$m_1$: massa a ser quantificada do constituinte; $A_1$: área do mesmo constituinte; Ap: área do padrão interno; mp= massa do padrão interno; RRF: Fator de resposta relativa previstos dos constituintes.

Assim como foram calculadas as quantificações com a utilização de RRFs, também foram calculadas as quantificações sem a utilização dos RRFs, sendo feitos os cálculos da seguinte maneira:

**Equação 03:**

$m_1 = \mathbf{A_1 x\ m_p / A_p}$

onde:

$m_1$= massa a ser quantificada do constituinte; $A_1$= área do constituinte; $A_p$= área do padrão interno; $m_p$= massa do padrão interno.

Para o preparo das soluções, foram pesados 17,74 µg da amostra do OEAg para o mês de Junho; 13,31 µg para o mês de Agosto; 8,87 µg para o mês de Novembro e 2,1 µg do Nerol que foi utilizado como padrão interno. Todas as amostras foram pesadas em balança analítica e diluída em até 1000 µL do solvente Tolueno. Um volume de 1 µL desta solução foi injetado.

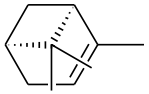
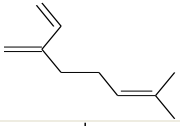
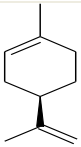
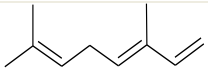
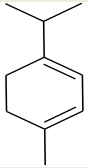
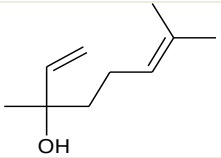
### 3.3 Levantamento dos Dados Meteorológicos

Os dados meteorológicos de Média de Índice Pulviométrico (MIP), Média T °C Mínima (MMin.) e Média T °C Máxima (MMáx.), foram apresentados com base no (INPE) com propriedade de (PMTCRH), estação de Jequié e município de Jequié na Bahia com a latitude de -13° 52’23,0”, longitude de -40° 04’19,0” e altitude de 305. (Disponível em: Weather Spark).

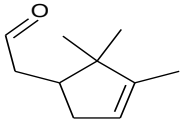
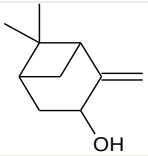
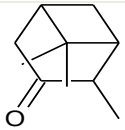
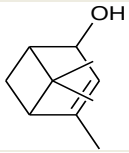
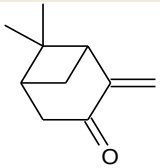
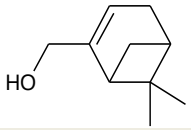
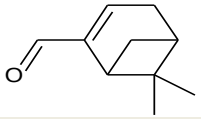
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparado com os dados obtidos nesta pesquisa pode-se constatar diferenças nas quantidades, bem como na identidade, dos constituintes majoritários, através da análise CG-EM. Na **(TABELA 01)**, são apresentados os 26 compostos identificados nos OE’s de *A. gratissima* obtidos em diferentes meses dos anos 2015, 2016 e 2017.

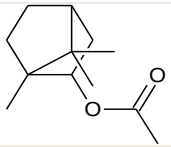
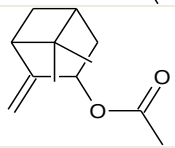
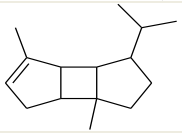
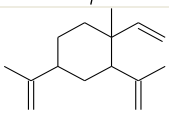
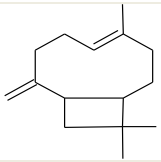
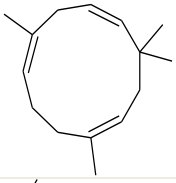
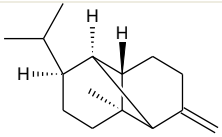
**Tabela 01.** Constituintes químicos presentes nos OEAg. (2015-2017).

| Constituintes | Estrutura | Área % | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Out/15 | Abr/16 | Ago/16 | Out/16 | Nov/16 | Mai/17 | Jun/17 | Ago/17 | $IK_{calc.}$ | $IK_{lit.}$ |
| α-Pineno |  | 1,10 | 3,19 | 2,15 | - | - | 11,75 | 3,62 | 0,96 | 934 | 939 |
| β-Pineno | | 10,23 | 33,86 | 12,76 | 0,91 | 0,91 | - | 7,05 | 13,08 | 974 | 980 |
| β-Mirceno |  | 3,14 | 5,19 | 4,7 | 0,14 | - | - | 6,09 | 4,32 | 993 | 992 |
| D-limoneno |  | 4,08 | 5,79 | 5,08 | 0,07 | - | 4,79 | 6,23 | 6,96 | 1031 | 1037 |
| β-ocimeno |  | 1,02 | 2,95 | 1,47 | - | - | - | 2,29 | 1,38 | 1056 | 1050 |
| Terpinoleno |  | 0,31 | - | 0,30 | - | - | - | 0,22 | 0,33 | 1098 | 1104 |
| Linalol |   | 0,65 | 0,86 | 0,45 | - | 0,86 | - | 1,12 | 1,37 | 1115 | 1110 |
| | | | | | | | | | | | |

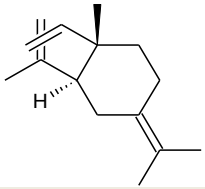
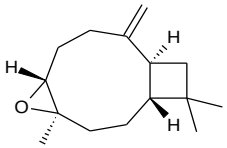
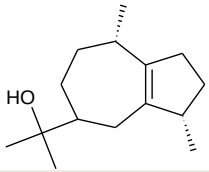
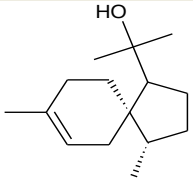
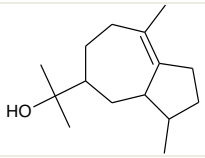
Cont**. Tabela 01**

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| α-Campolenal |  | 0,74 | - | 0,43 | 0,52 | 0,60 | - | 0,70 | 0,70 | 1131 | 1132 |
| (E)-Pinocarveol |  | 1,99 | 2,32 | - | 0,74 | 3,37 | - | 2,44 | 4,57 | 1136 | 1137 |
| Trans-Pinocanfona |  | 19,48 | 7,87 | 5,50 | 8,41 | 25,69 | - | 23,25 | 25,03 | 1158 | 1160 |
| Verbenol |  | - | - | - | - | 0,72 | - | 0,64 | *1,10* | 1143 | 1145 |
| Pinocarvona |  | - | 3,37 | - | 2,27 | - | - | 2,99 | - | 1164 | 1165 |
| (-)-Myrtenol |  | 2,64 | - | 0,39 | 1,23 | - | - | - | - | | |
| (-)-Myrtenal |  | - | - | - | - | 1,33 | - | 0,63 | 1,09 | | |

Cont**. Tabela 01**

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Acetato de bornil |  | - | - | 0,58 | 1,2 | 1,38 | - | 0,66 | 1,03 | 1264 | 1270 |
| Acetato de pinocarvil |  | 12,16 | - | 9,55 | 18,98 | 21,94 | - | 11,31 | 6,76 | 1258 | 1266 |
| α-Bourboneno |  | 0,61 | - | 0,23 | 0,35 | 0,41 | - | - | - | 1396 | 1384 |
| β-elemeno |  | 0,89 | - | 0,62 | 0,22 | 0,59 | - | - | - | 1397 | 1394 |
| Cariofileno |  | 5,4 | - | - | - | 5,51 | - | 1,51 | - | 1419 | 1420 |
| Humuleno |  | 1,58 | - | 1,44 | 1,17 | 1,27 | - | 0,25 | - | 1431 | 1455 |
| β-copaeno |  | 3,44 | - | 4,91 | 1,92 | 3,05 | - | 1,06 | - | 1453 | 1432 |

Cont**. Tabela 01**

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| σ-elemene |  | 7,31 | 0,75 | 0,58 | 4,86 | 4,57 | - | 1,02 | - | 1472 | 1482 |
| Óxido de Cariofileno |  | 5,93 | - | 2,74 | 6,22 | 4,05 | - | 0,68 | - | 1583 | 1586 |
| Guaiol |  | 9,49 | 4,38 | 10,68 | 10,59 | 7,72 | - | 2,61 | - | 1595 | 1597 |
| α-acorenol |  | 0,74 | - | - | - | - | - | - | - | 1634 | 1630 |
| Bulnesol |  | 3,95 | 1,15 | 5,18 | - | 2,33 | - | 0,75 | - | 1675 | 1666 |

**Fonte**: Própria

Foram assim, identificados exclusivamente terpenos, agrupados em quatro classes: MH, MO, SH e SO. As percentagens em área dos cromatogramas TIC foram calculadas para cada constituinte dos OE's, em geral, os monoterpenos foram os predominantes, sendo para os MH de 25,25% a 99,14% e para os MO 14,42 % a 55,94%, enquanto para os sesquiterpenos, tem-se para os SH desde não observados a 19,23% e para SO também, desde não observados a 20,11 % (**FIGURA 09**).

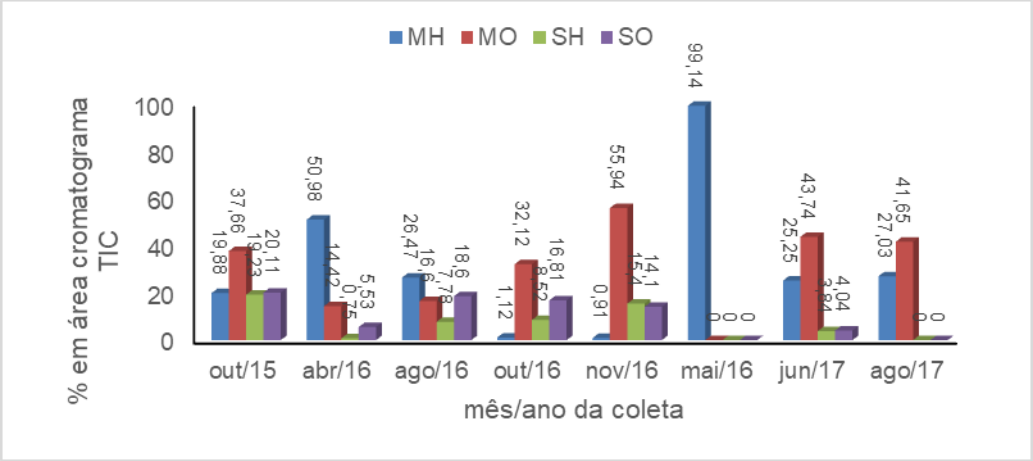



**Figura 09** – Percentuais das classes de terpenos obtidos do OE de *A. gratissima*.

**Legenda:** MH- Monoterpeno hidrocarbônico, MO – Monoterpeno oxigenado, SH – Sesquiterpeno hidrocarbônico, SO – Sesquiterpeno oxigenado.

Entre os monoterpenos, quase exclusivamente, os MH apresentam variações percentuais (0,91%) a (99,14%), enquanto para MO se observa (14,42%) a (55,94%). Entre os sesquiterpenos, os SO são predominantes aos SH.

A identidade e percentuais dos componentes sofrem variação sazonal, porém observa-se alguma similaridade entre a identidade dos constituintes químicos majoritários dos OE's, onde tem-se: β-pineno, MH; trans-pinocanfona, MO; acetato de pinocarvil e guaiol, SO**. (TABELA 02).**

**Tabela 02:** Dados estatísticos de constituintes marjoritários de *A. gratissima*.

| Componentes majoritários | Out/15 | Abr/16 | Ago/16 | Out/16 | Nov/16 | Mai/17 | Jun/17 | Ago/17 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| α-pineno | 1,10 | 3,19 | 2,15 | - | - | 11,75 | 3,62 | 0,96 |
| β-pineno | 10,23 | 33,86 | 12,76 | - | - | - | 7,05 | 13,08 |
| β-mirceno | 3,14 | 5,19 | 4,70 | 0,14 | - | - | 6,09 | 4,32 |
| D-Limoneno | 4,08 | 5,79 | 5,08 | - | - | 4,79 | 6,23 | 6,96 |
| Trans-pinocanfona | 19,48 | 7,88 | 5,50 | 8,41 | 25,69 | - | 23,25 | 25,03 |
| Acetato de pinocarvil | 12,16 | - | 9,55 | 18,98 | 21,94 | - | 11,31 | 6,76 |
| Guaiol | 9,49 | 4,38 | 10,68 | 10,59 | 7,72 | - | 2,61 | - |
| *Percentuais de terpenos* | | | | | | | | |
| MH | 19,88 | 50,98 | 26,47 | 1,12 | 0,91 | 99,14 | 25,50 | 27,03 |
| MO | 37,66 | 14,42 | 16,90 | 32,12 | 55,94 | NI | 43,74 | 41,65 |
| *Total mono.* | 57,54 | 65,40 | 43,37 | 33,24 | 56,85 | 99,14 | 39,24 | 68,68 |
| SH | 19,23 | 0,75 | 7,78 | 8,52 | 15,40 | NI | 3,84 | NI |
| SO | 20,11 | 5,53 | 18,60 | 16,81 | 14,10 | NI | 4,04 | NI |
| *Total sesq.* | 39,34 | 6,28 | 26,38 | 25,33 | 29,50 | NI | 7,88 | NI |
| | Out/15 | Abr/16 | Ago/16 | Out/16 | Nov/16 | Mai/17 | Jun/17 | Ago/17 |
| Rend. % (m/m) | 2,08 | 1,36 | 6,65 | 0,46 | 0,42 | 5,80 | 3,52 | 5,05 |
| ΔT ($^0$C) | 19,59 - 32,66 | 20,32 - 32,11 | 17,35 - 28,19 | 19,93 - 31,67 | 20,30 - 31,64 | 19,29- 29,52 | 18,19 - 28,05 | 16,39- 27,88 |
| IP (mm) | 1,41 | 16,24 | 10,96 | 31,20 | 20,16 | 26,24 | 17,02 | 2,63 |

**Legenda:** MH- Monoterpeno hidrocarbônico, MO – Monoterpeno oxigenado, SH – Sesquiterpeno hidrocarbônico, SO – Sesquiterpeno oxigenado. Rend. % - massa/massa; ΔT ($^0$C) – Temperatura (graus celsius), IP (mm) – índice pluviométrico (milímetros)

Dentre os marjoritários, os percentuais mais elevados apresentaram-se em: β-pineno: abr/16 (33,86%); trans-pinocanfona: out/16 (19,48%), nov/16 (25,69%), jun/17(23,25%) e ago/17(25,03%); acetato de pinocarvil: out/16(18,98%) e nov/16 (21,94%); guaiol: ago/16 (10,68%) e out/16 (10,59%).

Comparado os resultados obtidos ao publicado na literatura (SANTOS et al., 2013), observa-se que os constituintes majoritários para o OE de *A. gratissima*, cultivada em Minas Gerais, mudaram quantitativamente, porém preservando a predominância de monoterpenos no OE das folhas. Corroborando com essas informações (SOLER, et al. 1986), o OE de *A. gratissima* apresentou mais de (70%) de hidrocarbonetos, sendo mais da metade composta por sesquiterpenos como sabineno (30%) e β-pineno (8%). Outros constituintes presentes foram: cetonas, álcoois sesquiterpênicos e monoterpenos oxigenados. Em trabalho realizado com essa espécie cultivada em Goiania (FRANCO, et al., 2007), a análise realizada com a composição química do OE apresentou o alto teor de trans pinocanfona (18,42%), acetato de trans-pinocarvonila (13,55%) e β-pineno (14,06%). Tais informações, reafirmam o observado nesse trabalho, onde a composição química do OE de

*A. gratissima* sofre influencia nos percentuais de seus constituintes, preservando a identidade da classe de terpenos.

Foi realizada a quantificação de constituintes dos OEAg também no CG-DIC com amostras de óleos referentes aos períodos de Nov/16, Jun/17 e Ago/17. Devido a baixos rendimentos de algumas extrações para análise em CG-EM e a utilização em testes biológicos (anticolinesterásico e toxicidade aguda), não houve massa o suficiente para realização deste procedimento para outros períodos.

Analisando a **(TABELA 03)** (Nov/16) é possível observar que a recuperação global foi de 93% para o total de 18 constituintes identificados pelo CG-EM e quantificados no CG-DIC. Observou-se também a diferença entre os valores obtidos na quantificação realizada sem a utilização o do RRF (erro= 17%) em relação ao valor obtido com RRF (erro= -7%). Com esses cálculos, pode-se evidenciar que a obtenção desses valores aumentou o grau de confiabilidade dos resultados, conforme discutido por Tissot et. al. (2012), melhorando assim a precisão dos resultados.

Para Jun/17 conforme **(TABELA 04)** houve a recuperação global de 97% para o total de 22 constituintes, sendo obtidos os seguintes valores na quantificação: com RRF (-3%) e sem RRF (18%), observando-se assim que, os valores indicaram uma melhor recuperação com RRF em Jun/17 em relação á Nov/17.

A precisão dos resultados na quantificação gerou um grau de confiabilidade ainda muito maior nos resultados para a **(TABELA 05)** de Ago/17, onde a recuperação global foi de 99% para 14 constituintes e os valores de RRF melhoraram significativamente em relação aos períodos anteriores tanto com RRF (erro= -1%) como sem RRF (erro=15%).

**Tabela 03.** Dados do CG-DIC (Nov/16)

| | | | | | | COM RRF | | SEM RRRF | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **N° do pico** | **Nome** | **FM** | **Área** | **% Área** | **RRFcal** | **m (mg)** | **m%** | **m (mg)** | **m%** |
| ISTD | Nerol (P.I) | $C_{10}H_{18}O$ | 3196713 | 23,0% | 0,891 | 2,2 | 26,8% | 2,3939 | 23,0% |
| 1 | β-pineno | $C_{10}H_{16}$ | 16436 | 0,1% | 0,784 | 0,01 | 0,1% | 0,01 | 0,1% |
| 2 | Linalool | $C_{10}H_{18}O$ | 38670 | 0,3% | 0,891 | 0,02 | 0,3% | 0,03 | 0,3% |
| 3 | α-campolenal | $C_{10}H_{16}O$ | 19964 | 0,1% | 0,910 | 0,01 | 0,2% | 0,01 | 0,1% |
| 4 | (E)-pinocarveol | $C_{10}H_{16}O$ | 140412 | 1,0% | 0,910 | 0,09 | 1,1% | 0,11 | 1,0% |
| 5 | Trans-pinocanfona | $C_{10}H_{16}O$ | 429407 | 3,1% | 0,910 | 0,27 | 3,3% | 0,32 | 3,1% |
| 6 | Verbenol | $C_{10}H_{16}O$ | 44433 | 0,3% | 0,910 | 0,03 | 0,3% | 0,03 | 0,3% |
| 7 | Mirtenal | $C_{10}H_{14}O$ | 71996 | 0,5% | 0,930 | 0,05 | 0,6% | 0,05 | 0,5% |
| 8 | Bornil acetato | $C_{10}H_{20}O_2$ | 46868 | 0,3% | 0,982 | 0,03 | 0,4% | 0,04 | 0,3% |
| 9 | Trans pinocarvil acetato | $C_{12}H_{16}O_2$ | 577387 | 4,2% | 1,001 | 0,40 | 4,8% | 0,43 | 4,2% |
| 10 | α-borboneno | $C_{15}H_{24}$ | 30391 | 0,2% | 0,771 | 0,02 | 0,2% | 0,02 | 0,2% |
| 11 | β-elemeno | $C_{15}H_{24}$ | 32496 | 0,2% | 0,771 | 0,02 | 0,2% | 0,02 | 0,2% |
| 12 | Cariofileno | $C_{15}H_{24}$ | 124211 | 0,9% | 0,771 | 0,07 | 0,8% | 0,09 | 0,9% |
| 13 | Humuleno | $C_{15}H_{24}$ | 57395 | 0,4% | 0,771 | 0,03 | 0,4% | 0,04 | 0,4% |
| 14 | β-copaeno | $C_{15}H_{24}$ | 60523 | 0,4% | 0,771 | 0,03 | 0,4% | 0,05 | 0,4% |
| 15 | γ-elemeno | $C_{15}H_{24}$ | 104242 | 0,8% | 0,771 | 0,06 | 0,7% | 0,08 | 0,8% |
| 16 | Óxido de cariofileno | $C_{15}H_{24}O$ | 85286 | 0,6% | 0,833 | 0,05 | 0,6% | 0,06 | 0,6% |
| 17 | Guaiol | $C_{15}H_{26}O$ | 250333 | 1,8% | 0,833 | 0,14 | 1,7% | 0,19 | 1,8% |
| 18 | Bulnesol | $C_{15}H_{26}O$ | 79336 | 0,6% | 0,840 | 0,05 | 0,6% | 0,06 | 0,6% |
| | Não identificados | | 11670408 | 84,1% | 0,853 | 6,85 | 83,4% | 8,74 | 84,1% |
| | Soma das Massas encontradas | | 13880194 | 100,0% | | 8,2 | 1,0 | 10,4 | 1,0 |
| | Identificados | | 2209786 | 39,0% | | 8,9 | | | |
| | Recuperação global | | | | | 93% | | 117% | |
| | Erro | | | | | -7% | | 17% | |

**Legenda:** PI: Padrão interno; (*) Quantificação utilizando o RRF; (**) Quantificação com RRF = 1; IRteor: Índices de retenção teórico; IRcalc.: Índices de retenção calculado; Massa de OE de *A. gratissima* pesada foi de 8,9 mg; RRFmédio = 0,853 (não identificados).

**Tabela 04.** Dados do CG- DIC (Jun/17)

| | | | | | | COM RRF | | SEM RRRF | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| N° do pico | Nome | FM | Área | % Área | RRFcal | m (mg) | m% | m (mg) | m% |
| ISTD | Nerol (P.I) | $C_{10}H_{18}O$ | 1118912 | 11,1% | 0,8910 | 2,200 | 12,8% | 2,33082 | 11,1% |
| 1 | α-pineno | $C_{10}H_{16}$ | 54235 | 0,5% | 0,784 | 0,08 | 0,5% | 0,11 | 0,5% |
| 2 | β-pineno | $C_{10}H_{16}$ | 814736 | 8,1% | 0,784 | 1,26 | 7,3% | 1,70 | 8,1% |
| 3 | β-mirceno | $C_{10}H_{16}$ | 201626 | 2,0% | 0,784 | 0,31 | 1,8% | 0,42 | 2,0% |
| 4 | D-limoneno | $C_{10}H_{16}$ | 201020 | 2,0% | 0,784 | 0,31 | 1,8% | 0,42 | 2,0% |
| 5 | β-ocimeno | $C_{10}H_{16}$ | 14997 | 0,1% | 0,784 | 0,02 | 0,1% | 0,03 | 0,1% |
| 6 | Terpinoleno | $C_{10}H_{16}$ | 55604 | 0,6% | 0,784 | 0,09 | 0,5% | 0,12 | 0,6% |
| 7 | Linalool | $C_{10}H_{18}O$ | 101459 | 1,0% | 0,891 | 0,18 | 1,0% | 0,21 | 1,0% |
| 8 | α-copolenal | $C_{10}H_{16}O$ | 45561 | 0,5% | 0,910 | 0,08 | 0,5% | 0,09 | 0,5% |
| 9 | (E)-Pinocarveol | $C_{10}H_{16}O$ | 238073 | 2,4% | 0,910 | 0,43 | 2,5% | 0,50 | 2,4% |
| 10 | Verbenol | $C_{10}H_{16}O$ | 90977 | 0,9% | 0,910 | 0,16 | 0,9% | 0,19 | 0,9% |
| 11 | Trans-pinocanfona | $C_{10}H_{16}O$ | 1646861 | 16,4% | 0,910 | 2,95 | 17,2% | 3,43 | 16,4% |
| 12 | Pinocarvona | $C_{10}H_{14}O$ | 139133 | 1,4% | 0,930 | 0,25 | 1,5% | 0,29 | 1,4% |
| 13 | Mirtenal | $C_{10}H_{14}O$ | 677277 | 6,7% | 0,930 | 1,24 | 7,2% | 1,41 | 6,7% |
| 14 | Bornil acetato | $C_{12}H_{20}O_2$ | 44521 | 0,4% | 0,982 | 0,09 | 0,5% | 0,09 | 0,4% |
| 15 | Trans Pinocarvil | $C_{12}H_{18}O_2$ | 660683 | 6,6% | 1,001 | 1,30 | 7,6% | 1,38 | 6,6% |
| 16 | Cariofileno | $C_{15}H_{24}$ | 46237 | 0,5% | 0,771 | 0,07 | 0,4% | 0,10 | 0,5% |
| 17 | Humuleno | $C_{15}H_{24}$ | 15948 | 0,2% | 0,771 | 0,02 | 0,1% | 0,03 | 0,2% |
| 18 | β-copaeno | $C_{15}H_{24}$ | 15615 | 0,2% | 0,771 | 0,02 | 0,1% | 0,03 | 0,2% |
| 19 | γ-elemeno | $C_{15}H_{24}$ | 35097 | 0,3% | 0,771 | 0,05 | 0,3% | 0,07 | 0,3% |

Cont. **Tabela 04**

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 0,5% | 0,833 | | | | |
| 20 | Óxido de cariofileno | $C_{15}H_{24}O$ | 53190 | | | 0,09 | 0,5% | 0,11 | 0,5% |
| 21 | Guaiol | $C_{15}H_{26}O$ | 105764 | 1,1% | 0,833 | 0,17 | 1,0% | 0,22 | 1,1% |
| 22 | Bulnesol | $C_{15}H_{26}O$ | 37623 | 0,4% | 0,840 | 0,06 | 0,4% | 0,08 | 0,4% |
| | Não identificados | | 4739871 | 47,2% | 0,8485 | 7,91 | 46,1% | 9,87 | 47,2% |
| | Soma das Massas encontradas | | 10036108 | 100,0% | | 17,1 | 100% | 20,9 | 100% |
| | Identificados | | 5296237 | 52,8% | | 17,7 | | | |
| | Recuperação global | | | | | 97% | | 118% | |
| | Erro | | | | | -3% | | 18% | |

**Fonte**: Própria

**Legenda:** PI: Padrão interno; (*) Quantificação utilizando o RRF; (**) Quantificação com RRF = 1; IRteor: Índices de retenção teórico; IRcalc.: Índices de retenção calculado; Massa de OE de *A. gratissima* pesada foi de 17,7 mg; RRFmédio = 0,8485 (não identificados).

**Tabela 05.** Dados do CG- DIC (Ago/17)

| | | | | | | COM RRF | | SEM RRRF | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **N° do pico** | **Nome** | **FM** | **Área** | **% Área** | **RRFcal** | **m (mg)** | **m%** | **m (mg)** | **m%** |
| ISTD | Nerol (P.I) | $C_{10}H_{18}O$ | 3196713 | 14,6% | 0,8910 | 2,2 | 16,8% | 2,23808 | 14,6% |
| 1 | α-pineno | $C_{10}H_{16}$ | 6374 | 0,0% | 0,7840 | 0,00 | 0,0% | 0,00 | 0,0% |
| 2 | β-pineno | $C_{10}H_{16}$ | 257399 | 1,2% | 0,7840 | 0,14 | 1,1% | 0,18 | 1,2% |
| 3 | β-mirceno | $C_{10}H_{16}$ | 162151 | 0,7% | 0,7840 | 0,09 | 0,7% | 0,11 | 0,7% |
| 4 | D-limoneno | $C_{10}H_{16}$ | 130511 | 0,6% | 0,7840 | 0,07 | 0,5% | 0,09 | 0,6% |
| 5 | β-ocimeno | $C_{10}H_{16}$ | 32700 | 0,1% | 0,7840 | 0,02 | 0,1% | 0,02 | 0,1% |
| 6 | Terpinoleno | $C_{10}H_{16}$ | 7028 | 0,0% | 0,7840 | 0,00 | 0,0% | 0,00 | 0,0% |
| 7 | Linalol | $C_{10}H_{16}O$ | 65462 | 0,3% | 0,8910 | 0,04 | 0,3% | 0,05 | 0,3% |
| 8 | α-campolenal | $C_{10}H_{16}O$ | 27427 | 0,1% | 0,9100 | 0,02 | 0,1% | 0,02 | 0,1% |
| 9 | (E)-pinocarveol | $C_{10}H_{16}O$ | 206852 | 0,9% | 0,9100 | 0,13 | 1,0% | 0,14 | 0,9% |
| 10 | Trans-pinocanfona | $C_{10}H_{16}O$ | 170186 | 0,8% | 0,9100 | 0,11 | 0,8% | 0,12 | 0,8% |
| 11 | Verbenol | $C_{10}H_{16}O$ | 865196 | 3,9% | 0,9100 | 0,54 | 4,1% | 0,61 | 3,9% |
| 12 | Mirtenol | $C_{10}H_{16}O$ | 27630 | 0,1% | 0,9300 | 0,02 | 0,1% | 0,02 | 0,1% |
| 13 | Bornil acetato | $C_{12}H_{20}O_2$ | 22387 | 0,1% | 0,9820 | 0,02 | 0,1% | 0,02 | 0,1% |
| 14 | Trans pinocarvil | $C_{12}H_{18}O_2$ | 330237 | 1,5% | 1,0010 | 0,23 | 1,7% | 0,23 | 1,5% |
| | Não identificados | | 19597829 | 89,4% | 0,8677 | 11,70 | 89,2% | 13,72 | 89,4% |
| | Soma das Massas encontradas | | 21909369 | 100,0% | | 13,1 | 1,0 | 15,3 | 1,0 |
| | Identificados | | 2311540 | 10,6% | **O.E(ug)** | 13,3 | | | |
| | Recuperação global | | | | | 99% | | 115% | |
| | Erro % | | | | | -1% | | 15% | |

**Fonte**: Própria

**Legenda:** PI: Padrão interno; (*) Quantificação utilizando o RRF; (**) Quantificação com RRF = 1; IRteor: Índices de retenção teórico; IRcalc.: Índices de retenção calculado; Massa de OE de *A. gratissima* pesada foi de 13,3 mg; RRFmédio = 0,8677 (não identificados).

Observando os meses de coleta: outubro, novembro e abril são os meses mais quentes na região, com máximas de temperatura acima de 30 $^{0}$C e menor rendimento % do OE. Maio, junho e agosto são os meses de temperaturas mais amenas, máximas abaixo de 30 $^{0}$C e maior rendimento Conforme **(TABELA 02).**

De um modo geral a produção ou síntese de óleos voláteis, tende a aumentar em temperaturas mais elevadas, apesar do risco de grandes perdas por evaporação em dias muito quentes. Na região sudoreste da BA, nos dias mais quentes são perceptíveis as baixas umidades do ar, o que favorece a evaporação dos OE e baixos rendimentos nos meses de abril, outubro e novembro. Além do fato de que os meses de junho, agosto e setembro serem os meses de floração da planta e consequente aumento da produção OE para a atração de polinizadores.

Apesar do rendimento ser influenciado pelos valores de temperatura, não se observa variação na identidade dos constituintes dos OE's, mantendo a relação de maiores proporções em área, do cromatograma TIC **(APÊNDICES)**, para os monoterpenos sobre os sesquiterpenos. **(FIGURA 10)**

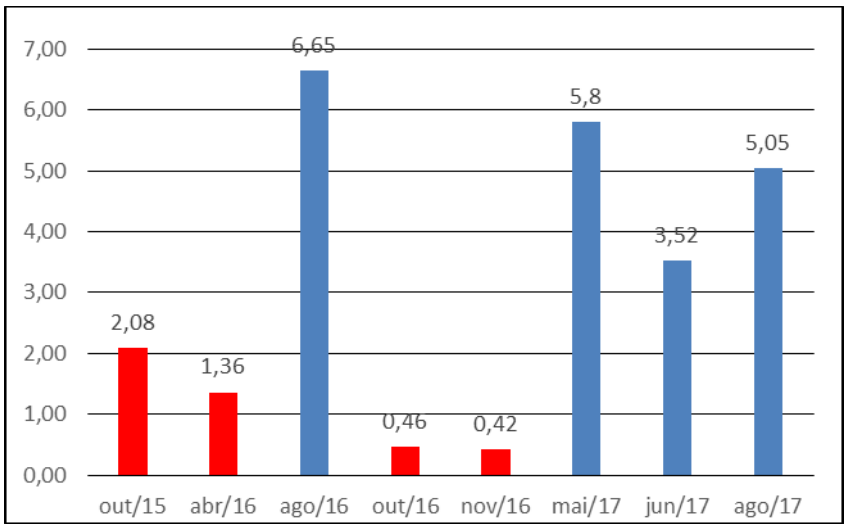



**Figura 10:** Rendimento de OE's de *Aloysia gratissima*.

A distribuição de chuvas na região é muito irregular, podendo apresentar meses oficialmente considerados secos ou chuvosos com índices pluviométricos diferentes de um ano para outro. Quanto a composição química dos OE's tem-se que, em todas as coletas o percentual de monoterpenos se mantém predominante sobre a de sesquiterpenos.

Observando dos meses de outubro e novembro de 2016 tem-se a associação de máximas de temperatura elevadas com MIP alto, resultando na redução dos percentuais de MH em relação ao MO.

As condições climáticas podem beneficiar a biossíntese de um constituinte terpenoídico por um vegetal, através do favorecimento da atividade enzimática. As variações de temperatura influenciam a atividade das enzimas envolvidas na síntese de terpenos, e esta, sendo uma variável sazonal, pode justificar o aumento do rendimento na produção do OE, bem como a identidade dos constituintes identificados.

O longo do ano as temperaturas na região figuram entre 17 $^{0}$C e 32 $^{0}$C, raramente inferiores a 15 $^{0}$C. Quanto a MIP oscila em valores inferiores a 100 mm/mensais. Devido a essas oscilações, outubro de 2016 apresentou alta temperatura, baixo MIP e baixo rendimento de sesquiterpenos.

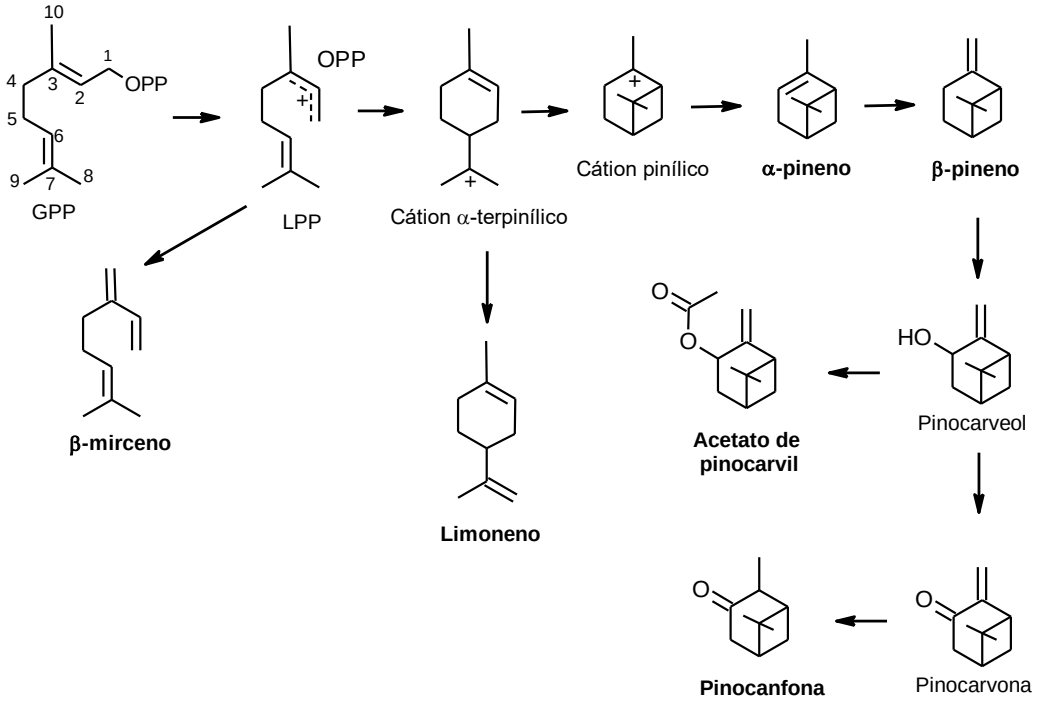



**Figura 11:** Possíveis rotas biossintéticas de monoterpenos e sesquiterpenos presentes em OEAg.

Os compostos encontrados no OEAg apresentam uma biossíntese com intermediários interligados, justificando uma variação entre esses compostos ao longo do período de estudo. O GPP, **(FIGURA 11)**, por subsequentes, rotação da

ligação C2-C3 e ionização resulta no cátion LPP, que apresenta características espaciais (configuração Z) favoráveis a ciclização molecular. Dessa forma além de formar o **β-mirceno**, pela perda de próton no C10 e ciclização tem-se o cátion α-terpinílico, intermediário na biossíntese dos monoterpenos cíclicos. Sendo assim, a desproponação do cátion α-terpinilíco leva a formação do **limoneno**. O cátion α-tepinílico sofre ciclização eletrofílica gerando o cátion pinílico, cuja desprotonações em C4 ou em C10 geram **α-pineno** e **β-pineno**, respectivamente. O β-pineno, sob ação enzimática do citocromo P-450, forma o pinocarveol, que por sua vez, ou sofre acilação enzimática levando ao **acetato de pinocarvil** ou disidrogenação oxidativa resultando na pinocarvona, seguido do hidrogenação para a conversão em **pinocanfona** (de Barros et al. 2009).

# 5 CONCLUSÃO

O estudo da composição química das folhas da espécie *A. gratissima* (Verbenaceae) conhecida popularmente por “Alfazema” coletada na região de Poço Dantas, povoado de Jequié situado no Sudoeste da Bahia levou a identificação de 26 constituintes químicos, pertencentes a classe dos terpenos, sendo: monoterpenos hidrocabônicos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos hidrocarbônicos e sesquiterpenos oxigenados.

Os dados obtidos nesse trabalho, em comparação ao OEAg de outras regiões do país, indicam que há uma influencia das condições climática da região sobre a quantidade de OE produzido e os percentuais dos constituintes químicos encontrados como majoritários, permanecendo a classe química de mono e sesquiterpenos.

O rendimento do OEAg aprsenta-se em menores quantidades nos meses de outubro, novembro e abril, onde observa-se médias de temperatura mais elevados e baixa umidade do ar. Os meses de coleta de maio, junho e agosto, onde as medias de temperatura são mais amenas, tem-se um maior rendimento. Os constituintes majoritários identificados em todos os meses do estudo foram: β-pineno, pinocanfona, acetato de pinocarvil e guaiol.

Foi realizada também na pesquisa a quantificação de OEAg no CG-DIC para os períodos de Nov/16, Jun/16 e Ago/16 melhorando a precisão dos resultados. A recuperação global apresentada no CG-DIC foi de 93%, 97% e 99% para os respectivos períodos.

O estudo químico de plantas de região semiárida do Bahia, reflete um esforço de pesquisadores para agregar valor a esse bioma negligenciado. Permitindo o desenvolvimento humano e preservação da caatinga baiana, tornando-a uma fonte de informações e produtos de valor sócio-economico.

# CAPÍTULO 02

# TESTES BIÓLOGICOS COM ÓLEOS ESSENCIAIS DA *Aloysia gratissima* (VERBENACEAE)

- LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

## 2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICOLINESTERÁSICO

A avaliação biológica foi uma das mais significantes mudanças na área de produtos naturais nos últimos anos. O entendimento dos mecanismos da doença, acompanhado do aumento de testes com receptores e enzimas disponíveis, permitiram o desenvolvimento de sistemas eficientes e rápidos de bioensaios. (CORDELL, 1995).

A modernização dos ensaios permitiu a utilização de enzimas, receptores, DNA, entre outros alvos, para a avaliação rápida de grandes quantidades de amostras. Dentre os bioensaios rápidos e sensíveis, a utilização da enzima acetilcolinesterase é uma alternativa para seleção e detecção de amostras com a ação anticolinesterase. (TREVISAN; MACEDO, 2003).

A atividade inibitória sobre as enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) é considerada como uma das estratégias farmacológicas atualmente disponíveis para retardar a progressão dos danos cognitivos associados à doença de Alzheimer (DA). Assim, estudos vêm sendo realizados visando a descoberta de novos compostos potencialmente úteis, capazes de amenizar o déficit colinérgico neural e proporcionar um aumento da disponibilidade de para as sinapses colinérgicas. (KONRATH et al., 2013).

A AChE tem importância inquestionável nas sinapses colinérgicas existentes no sistema nervoso central e periférico. Tal enzima apresenta três ramificações, ligadas por pontes de dissulfeto, sendo fixada à membrana celular por colágeno. Cada ramificação é uma unidade enzimática, composta por quatro subunidades protéicas, capazes de hidrolisar a ACh. Os aminoácidos presentes nestas subunidades catalíticas, fundamentais para a sua atividade, são os resíduos de

histidina e serina (Araújo et al., 2013; Patrick, 2009). A ACh (**FIGURA 12**) é sintetizada a partir da colina e acetilcoenzima A (Acetil-CoA), sob catálise da colina acetilcolinesterase. Esse processo ocorre no neurônio pré-sináptico. Após estímulo e liberação, na fenda sináptica, a ACh se liga no receptor pós-sináptico propagando informação. Em seguida, a molécula volta a fenda sináptica, ocorrendo a hidrolise catalisada pela AChE, resultando em ácido acético e colina Araújo et. al. (2016), apud, Fifer (2007).

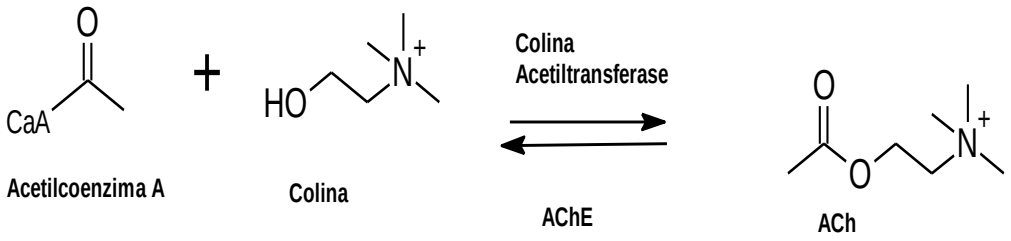



**Figura 12.** Síntese e hidrólise da ACh

O ensaio anticolinesterásico foi realizado segundo o método de Ellman que é baseado na taxa de hidrólise da acetiltiocolina pela AChE dando origem à tiocolina, que reage com o ânion carboxilato do DTNB, formando o 2 nitrobenzoato 5-mercaptotiocolina e um ânion de coloração amarela, o 5-tio-2nitrobenzoato, que é quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda de aproximadamente 412 nm (ARAÚJO et. al. 2016)

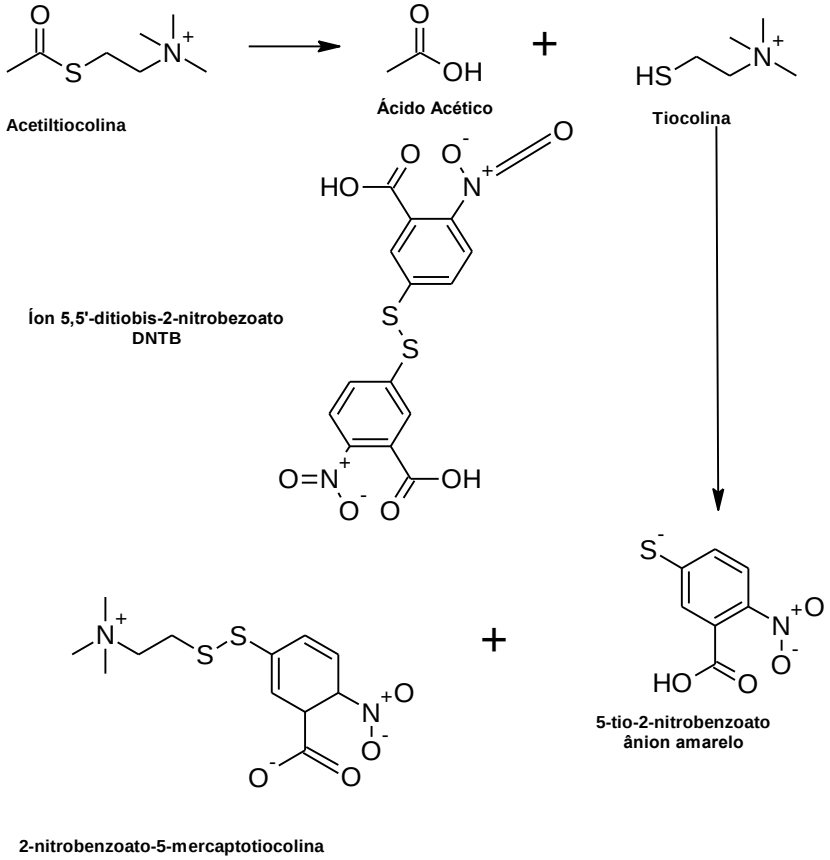



**Figura 13:** Formação do ânion amarelo do 5-tio-2-nitrobenzoato resultado da reação entre a tiocolina e o íon 5,5,'-ditiobis-2-nitrobenzoato. (adaptado de Araújo et. al. 2016). **Fonte**: Própria

Estudos realizados com o óleo essencial de *A. gratissima*, demonstrou efeito anestésico para a espécie de peixe Paralichthys orbignyanus e sobre o sistema nervoso central, sendo verificado a inibição da AChE no músculo, aumentando os níveis de acetilcolina. O fracionamento bio-guiado do óleo essencial, permitiu o isolamento de: E-(-)-pinocamona, (-)-óxido de cariofileno, (-)-guaiol e (+)-espatulenol. O constituintes do óleo esencial fracionados ou isolados, também foram avaliados, indicado que: a E-(-)pinocanfona aprensenta os mesmos efeito colaterais do óleo essencial; (-)-óxido de cariofileno, (-)-guaiol e (+)-espatulenol apresentaram apenas efeitos sedativos em concentrações proporcionais aos dos constituintes em óleo essencial; (+)- espatulenol (51,2 mg L-1) promoveu anestesia profunda, sem efeitos colaterais. Tem-se assim, que óleos essenciais cujos constituintes majoritários pretencem as classes mono e sesquiterpenos apresentam atividade inbidora elevada para a enzima AchE. (BENOVIT et al., 2012; BENOVIT et al., 2015; SOUZA, et al., 2010).

# 3 PARTE EXPERIMENTAL

- **Atividade anticolinesterásica**

A amostra destinada ao teste foi o óleo essencial coletado no mês de outubro de 2016. O presente teste foi realizado em parceria com a equipe de laboratório da Universidade Estadual de Feira de Santana.

Primeiramente, foi adicionado nas cavidades das microplacas 140 µL de tampão fosfato pH 7,5, 20 µL da enzima acetilcolinesterase (0,5 U/mL), 20 µL das amostras a serem testadas (1 mg/mL para o óleo essencial e 500 µmol para o padrão eserina – solução etanólica). A placa foi então incubada a 37±1°C por 10 minutos sendo, em seguida, adicionado 10 µL de ácido 5-5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (10 mM) e 10 µL de iodeto de acetiltiocolina (15 mM).

A absorbância foi monitorada a cada 10 minutos, até atingir o tempo de 60 minutos, em λ = 405 nm em leitor de microplacas MultiskanTM GO 3.2 (**FIGURA 14).**

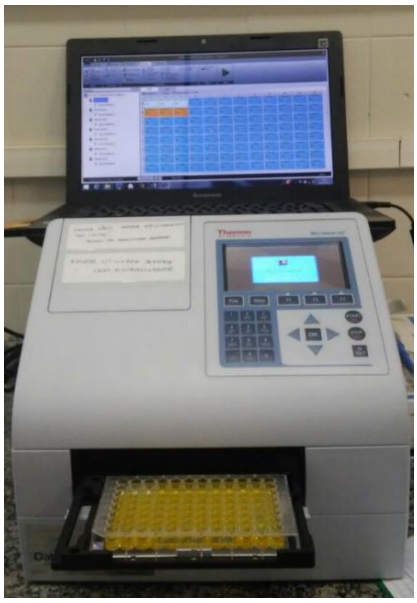


**Figura 14:** Teste de atividade anticolinesterásica. **Fonte**: UEFS

A porcentagem de inibição foi calculada, conforme a equação abaixo:

$$\%IAChE = \frac{(\Delta Ab - \Delta Ai)}{\Delta Ab} x\ 100$$

Em que, %IAChE é a porcentagem de inibição da AChE, ΔAb é a diferença de absorbância do branco no tempo final e o no tempo inicial, enquanto que ΔAi é a

diferença de absorbância do inibidor (padrão ou amostra) no tempo de final e no tempo inicial. Todo o teste foi realizado em triplicata.

# 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O OEAg obtido em out/16, segunda análise por CG-EM, apresenta como constituintes majoritários, os MO acetato de pinocarvil (18,98%) e trans-pinocanfona (8,41%) e os SO óxido de cariofileno (6,22%) e guaiol (10,68%). O resultado foi percentual de inibição da enzima AChE, observado nesse estudo, foi de 83,19%, considerado bastante significativo em comparação ao padrão (eserina) com 96,03%. O que se justifica por dados na literatura, onde tem-se a informação sobre a correlação entre a composição química do óleo essencial, rico em mono e sesquiterpenos, a elevação ação inibidora frente a enzima AChE (SAVELEV et al., 2003).

Para a OEAg out/16, a presença de vários outros sesquiterpenos: α-Borboneno (0,35%), β-elemeno (0,22%), Humuleno (1,17%), β-copaeno (1,92%) e γ-elemeno (4,86%) e do sesquiterpeno oxigenado: guaiol (10,59%) também contribuíram para o efeito inibitório, já que Savelev et. al. (2003) aborda que, para o aumento da atividade também pode ocorrer sinergismo entre outros constituintes.

**Figura 15:** Gráfico com percentual de inibição de OEAg para atividade nticolinesterástica. **Fonte**: Própria

Observa-se em outros trabalhos que, realizando testes de ação inibidora a AChE, por meio do método clássico colorimétrico que, amostras onde se observa a presença de moléculas com ligações duplas conjugadas e monoterpenos

hidrocarbonados tem-se um aumento o efeito inibitório. O efeito inibitório significativo observado para OEAg out/16 pode ser justificado também pela presença dos monoterpenos hidrocarbonados como: β-pineno (0,91%), β-mirceno (0,14%) e D-limoneno (0,07%), observados em sua constituição e com observada ação inibidora (MIYAZAWA et al..,1997; CECHINEL & YUNES 2014).

# 5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE TOXICIDADE SOBRE LARVAS DO MICROCRUSTÁCEO ARTEMIA SALINA

## 5.1 Referencial Teórico

No cenário medicinal são utilizadas diversas ervas como fitoterápicas, no entanto, pouco se sabe a respeito do potencial toxicológico dessas plantas. Por outro lado, a toxidez dos alimentos é um fator primordial para estabelecer o limite consumível do mesmo, no entanto, esse fator ainda é pouco visto diante de sua importância (PEREIRA et al., 2012).

Uma forma de complementar os estudos fitoquímicos é associá-los a bioensaios, por esta razão, muitos laboratórios de Produtos Naturais têm inserido a suas rotinas ensaios biológicos simples, no intuito de selecionar e monitorar a pesquisa de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas (NASCIMENTO et. al. 2008).

Segundo Calvalcante et. al. (2000), a avaliação da bioatividade de compostos orgânicos, sejam eles provenientes de plantas ou de síntese, tem sido pouco viável em laboratórios tradicionais de química. Geralmente, os testes são desenvolvidos com a colaboração de outros laboratórios com biólogos ou farmacólogos. A necessidade de realizar ensaios com procedimentos simples e rápidos levou a busca de novos testes.

Para verificar o potencial de toxicidade em estudo com plantas medicinais ou fitoterápicos de diversas formas como: chás, infusão, decoctos ou extratos, deve-se

iniciar o estudo de $DL_{50}$.. Segundo Di Stasi (1996), para que se tenha confiança no emprego de tratamentos farmacológicos. Sendo assim, a $DL_{50}$ pode ser definida como o nível de dose no qual morrem 50% de animais tratados, e esta é obtida por análise de regressão linear.

O teste de letalidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* desenvolvido por Meyer *et al*. (1982) é corriqueiramente usado para determinar a toxicidade de diferentes produtos naturais, sendo considerado um bioensaio preliminar. Baseia-se na premissa de que compostos bioativos são tóxicos em baixas doses e a resposta biológica envolve apenas um parâmetro: morte ou vida desses microcrustáceos. Este método apresenta uma boa correlação com as atividades antitumorais (OSTROSKY et al. 2008), tripossomicida, larvicida e inseticida (HAMBURGER & HOSTETTMANN, 2013)

Em 1982, Meyer e colaboradores estabeleceram uma relação entre o grau de toxicidade e a concentração letal média ($DL_{50}$), apresentada por extratos de plantas sobre Artemia salina, considerando que valores acima de 250 $\mu g.mL^{-1}$ são considerados com baixa toxicidade, entre 80 e 250 $\mu g.mL^{-1-}$ moderadamente citotóxicos e $DL_{50}$ menor que 80 $\mu g.mL^{-1}$ considerados tóxicos (THOMAS, 2015). O ensaio de letalidade frente a *A. salina* apresenta uma boa reprodutibilidade além de possuir uma boa correlação com ensaios antitumorais (80 $\mu g.mL^{-1} < DL_{50} > 500$ $\mu g.mL^{-1}$), atuando como uma prospecção antitumoral. Apresentando ainda, correlação com atividade inseticida ($DL_{50} < 320$ $\mu g.mL^{-1}$) e anti-Trypanossoma cruzi ($DL_{50} <80$ $\mu g.mL^{-1}$), podendo então ser utilizado para monitorar extratos potencialmente citotóxicos (AMARANTE et al., 2011).

No trabalho descrito por Siqueira et. al. (1998), os extratos de folhas, sementes e de cascas do caule de *U. lindmanii* – Annonaceae- foram submetidos ao ensaio frente *Artemia salina*. Destes, apenas o extrato das cascas do caule foi considerado ativo, ou seja, menor que (1000 ppm). A toxicidade para *A. salina* convergiu para os extratos que continham uma substância reconhecida ativa, o alcalóide oxaporfínicoliriodenina.

Já no trabalho descrito por Lima et. al. (2009), o teste foi realizado com extrato aquoso de *Sonchus Oleraceus* apresentou em sua composição açúcares redutores, compostos fenólicos, taninos, flavonoides e cumarinas; as mesmas

substâncias observadas no extrato etanólico, a exceção da cumarina. Os resultados apontaram ser o extrato aquoso inativo, com $DL_{50}$ de 5.117,2 ppm.

Nos estudos realizados por Bertarello (2011), com extrato aquoso de folhas de Aloysia gratissima, verificou-se o perfil fitoquímico e agentes terapêuticos, dentre eles, o estudo de toxicidade aguda e os mecanismos responsáveis pelos efeitos.

Percebe-se que de acordo com a literatura, ainda são poucos os testes de toxicidade realizados com óleos essenciais, em sua grande maioria, estes testes são realizados com extratos. O presente trabalho surge como uma de necessidade de informações sobre a toxicidade de OE de plantas de uma região semi-árida, sudoeste da Bahia.

## 5.2 Parte Experimental

Os OEAg selecionados para a realização do teste de frente a A salina, foram os relativos aos meses de Mai/17 e Jun/17. Inicialmente, foi preparada uma solução de sal marinho em água mineral não clorada (35%) para a incubação do microcrustáceo (15 mg) que foram exposto a luz artificial durante 48 horas. **(FIGURA 16)**

**Figura 16:** Aquário com náuplios de Artemias salinas para teste de toxicidade.
**Fonte**: Própria

Para o teste de letalidade, em tubos de ensaio contendo soluções do EOAg em diclometano nas concentrações 453,1 µg/mL; 226,6 µg/mL; 90,6 µg/mL; 45,3

µg/mL; 18,1 µg/mL; 9,1 µg/mL, após secos foram adicionados 5 mL da solução salina, 1 µL de TWEEN 80 e 10 *náuplios*. Os testes foram realizados em triplicata. **(FIGURA 17)**

**Figura 17:** Concentrações de amostras de OEAg para teste de toxicidade.
**Fonte**: Própria.

Um grupo controle também foi preparado nas mesmas condições sem a presença das amostras. O $K_2CrO_7$ foi utilizado como o padrão de toxidez (0,0011 $\mu g.mL^{-1}$). Os tubos de ensaios foram mantidos sob luz artificial e temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, foi realizada a contagem do número de *náuplios* sobreviventes do grupo controle e dos grupos expostos aos extratos.Com os dados de sobreviventes obtidos, estimou-se a $DL_{50}$ através do método PROBIT de análise com 95% de confiança, utilizando-se o Programa Oring 06. Os extratos com $DL_{50}$ maiores que 1000 $\mu g.mL^{-1}$ foram considerados inativos.

## 5.3 Resultados e Discussão

Os OEAg apresentaram como uma constituição química composta por monoterpenos hidrocarbonados, monoterpenos oxigenados e sesquiterpenos hidrocarbonados e oxigenados **(TABELA 2)**. Para Mai/17 estavam presentes: α-pineno (11,75%), β-pineno (82,6%) e D-limoneno (4,79%). Já para o período de Jun/17 estavam presentes vários constituintes, sendo os principais ou majoritários: α-pineno (3,62%), β-pineno (7,05%), β-mirceno (6,09%), D-limoneno (6,23%), trans-

pinocanfona (23,25%), acetato de trans-pinocarvil (11,31%), cariofileno (5,51%),óxido de cariofileno (4,05%) e guaiol (7,72%).

Os resultados do teste de toxicidade frente ao microcustácio *A. salina* foram expressos baseados na média de três experimentos, considerou-se alto potencial antimalárico quando a $DL_{50}$ foi inferior a 10 µg.mL$^{-1}$, potencial moderado para $DL_{50}$ entre 10 e 100 µg.mL$^{-1}$ e baixo potencial quando a $DL_{50}$ foi superior a 100 µg.mL$^{-1}$.

Os EO's testados apresentaram letalidade de 100% dos indivíduos sob concentrações entre 45,30 mg. mL$^{-1}$ e 90,63 µg.mL$^{-1}$. O $DL_{50}$ calculado, para cada amostra testada, foram de 49,88 mg.mL$^{-1}$ para Mai/17 e 50,44 mg.mL$^{-1}$ para Jun/17. Os OE's caracterizam-se como tóxicos e um potencial anti-Trypanossoma cruzi, como indicativo do teste. O sequenciamento entre os meses testados, maio de junho, torna similar composição química dos OE, ricos em MO e MH, e como consequência, valores de $DL_{50}$ próximos.

Estudos realizados com OE's de *A. citodora*, *A. lycioides* e *A.dusenii*, coletadas no Rio Grande do Sul (THOMAS, 2015), apresentaram composição química rica em mono e sesquiterpenos. A letalidade das larvas de Artemia salina foi de 100% sob concentrações entre 100 mg.mL$^{-1}$ e 500 mg.mL$^{-1}$, no presente trabalho, esses valores foram menores (entre 45,30 mg. mL$^{-1}$ e 90,63 µg.mL$^{-1}$). Os valores de $DL_{50}$ calculados para os OE's de *A. citodora*, *A. lycioides* e *A.dusenii* foram, respectivamente, 55,96 µg.mL$^{-1}$, 48,12 µg.mL$^{-1}$ e 48,98 µg.mL$^{-1}$, valores próximos aos aqui encontrados para *A. gratissima*. Tais observações, apontam um efeito sinérgico entre os componentes terpenicos, majoritários e minoritários, presentem na composição química o OE de plantas do gênero.

# 6 CONCLUSÃO

O presente estudo de OE extraídos em folhas de *A. gratissima* (Alfazema), permitiu a realização de dois testes Biológicos: Avaliação do potencial anticolinesterásico e avaliação de toxicidade frente a *A. salinas*.

O estudo anticolinesterásico apresentou o percentual de inibição com 83,18% para OEAg, onde o padrão utilizado foi a eserina já conhecida na literatura que

apresentou o percentual de inibição de 96,03%, o que significa que o percentual de inibição elevado, em comparação ao padrão.

Os EO's testados apresentaram letalidade de 100% dos indivíduos sob concentrações entre 45,30 mg. $mL^{-1}$ e 90,63 µg.$mL^{-1}$. O $DL_{50}$ calculado, para cada amostra testada, foi de 49,88 mg.$mL^{-1}$ para Mai/17 e 50,44 mg.$mL^{-1}$ para Jun/17. Sendo indicativo da toxicidade do OEAg frente ao microcustácio *A.salina.*

Percebe-se que diante do exposto, as contribuições fornecidas no presente estudo, servem informações da área de Produtos Naturais e testes biológicos realizados com óleos essenciais com espécies de plantas medicinais cultivadas e coletadas nas regiões do sudoeste da Bahia.

# CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados apresentados pela presente dissertação contribuiram significativamente com informações sobre a composição química do OE, em função da sazonalidade, da espécie de *A. gratissima* (Alfazema) da região do Sudoeste da Bahia. Tal pesquisa originou novos conhecimentos coerentes com constituíntes voláteis do material vegetal (folhas) da referida planta, além de novos dados em relação aos testes biológicos: anticolinesterásico e de toxicidade frente à *A. salina*.

A presente pesquisa corrobora de forma sistemática com o desenvolvimento de habilidades, formação acadêmica e profissional do mestrando, onde foi possível o mesmo lidar com conhecimentos teórico-práticos relacionados à interpretação e execução de dados e técnicas espectrométricas e cromatográficas de analises químicas.

# REFERÊNCIAS


ADAMS, R. P.; **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatrography/Mass Spectometry**, 4th edition; llinois: Allured Publishing Corporation, 2007, 700p.

ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. dos A.; GONSALVES A. A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Rev. Virtual Quim**., v. 8, n.6, p.1818-1834. 2016.

AMARANTE, C. B.; MÜLLER, A. H.; PÓVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à Artemia salina e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (Montrichardia linifera). **Acta Amazonica**, v. 41, n.3, p. 431-434. 2011.

BAILAC, P. N.; DELLACASA, A. D. DUSCHATZKY, C. B.; FIRPO, N.; FONZI, M. I. Composition of the essential oil of Aloysia gratissima from San Luiz, Argentina. **Anales de La Association Química**. Argentina, v. 87, p. 149-153. 1999.

BANKOVA V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie,** .v. 29, p. 361-367. 1998.

BARROS, F.M.C.; ZAMBARDA, E. O.; HEINZMANN, B. M.; Sazonal e Biossíntese de Terpenóides presents no oleo Essencial de Lippia alba (Mill) N. E. Brown (verbenaceae). **Química Nova.** Vol. 32. Nº 4. 861-867, 2009.

BARROSO GM. **Sistemática de Agiospermas no Brasil**. São Paulo. EDUSP: 1978.

BELL, E. A.; CHARLWOOD, B. V. **Secundary plant products.** New York: Springer-Verlag, 1980.

BENOVIT, S. C.; GRESSLER, L. T.; SILVA, L. L. Anesthesia and Transport of Brazilian Flounder, Paralichthys orbignyanus, with Essential Oils of Aloysia gratissima and Ocimum gratissimum. **Journal of the world aquaculture societ.,** v. 43, n. 6, Dec., 2012.

BENOVIT, S. C.; SILVA, L. L.; SALBEGO, J.; LORO, V. L.; MALLMANN, C. A.; BALDISSEROTTO, B.; FLORES, E. M.; HEINZMANN, B. M. Anesthetic activity and bio-guided fractionation of the essential oil of Aloysia gratissima (Gillies & Hook.) Tronc. in silver catfish Rhamdia quelen. **An Acad Bras Cienc,** v. 87, n. 3, 2015.

BERTARELLO, A. L.; **Estudo fitoquímico, toxicológico e dos efeitos neuroprotetor e tipo antidepressivo do extrato aquoso de *Aloysia gratissima* (Gil e Hook) trancoso (Erva Santa)**. 2011, Tese (Doutorado Neurociências), UFSC, Florianópolis, 2011. 237p.

BIZZO. H. R.; HOVELL. A. M C.: REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. Instituto de química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594. 2009.

BORCHARDT, J. K. **Drug News Perspect**. v. 15, p. 187. 2002.

BRANT, R. S.; PINTO, J. E. B.; BERTOLUCCI, S. K. V.; ALBURQUEQUE, C. J. B. Teor do óleo essencial de Cidrão (*Aloysia triphylla)*(L' Herit) Britton Verbenaceae) em função da variação sazonal. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais** v. 10, p. 83-88. 2008.

CACHET, T.; BREVARD, H.; CHAINTREAU, A.; DEMYTTENAERE, J.; FRENCH, L.; GASSENMEIER, K.; JOULAIN, D.; KOENIG, T.; LEIJS, H.; LIDDLE, P.; LOESING, G.; MARCHANT, M.; MERLE, Ph.; SAITO, K.; SCHIPPA. C.; SCEIPPA, C.; SMITH, T. IOFI recommended practice for the use of predicted relative response factors for the rapid quantification of volatilie flavouring compounds by GC-FID. **Flavour Fragrance Journal**, v. 31, p. 191-94, 2016.

CARVALHO, R. M.; CASALI, V. W.D. **Plantas medicinais e aromáticas:** Relações com luz, estresse e insetos. Viçosa: UFV, 1999. 148p.

CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A. Sintese de 1,3,5 - triazinas substituídas e avaliação de toxicidade frente a artemia salina leach. **Química Nova,** v. 23, n. 1, 2000.

CECHINEL FILHO, Valdir. **Química de Produtos Naturais: Novos fármacos e a moderna farmacognosia.** 4ª Edição, Itajaí-SC, Univali, 2014, 492p.

CORDELL, G. A.; **Phytochemistry** 1995, 40, 1585.

COSTA, P. S.; SOUZA, E. B.; BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S. Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero Lippiasensu lato (Verbenaceae). **Hoehnea**, v. 44, n. 2, p. 158-171, 1 tab., 1 fig., 2017

DEWICK, P, M. The mevalonate and deoxyxylulose phosphate pathwais. Terpenoids and Steroids. In: **Medicinal Natural Products**, Jhon Willey & sons Ltda., 168p. 2002.

DEWICK, P, M. "**Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach".** Third Edition, Jhon Willey & sons Ltd, England, 2009.

DI STASI, L.C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência**: Um Guia de Estudos Multidisciplinar. São Paulo: Ed. Universidade Paulista. 1996. 230p.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 34. **Análise de distribuição da frequência Mensal de Precipitação para a Sub-região da Nheconlândia Pantanal**, Mato Grosso do Sul, Brasil. Corumbá-MS, 2002.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

FEHLBERG, I. **Terpenos e Fenilpropanoides de *Myrcia guianensis* (MYRTACEAE).** 2011. Tese (Doutorado em Química). UFBA, 2011.

FIFER, E. K. **Em Foye's Principles of Medicinal Chemistry**, 6. ed.; Lemke, T. L.; Williams, D. A., eds.; Lippincott Williams & Wilkins, 2007, cap. 12.

FRANCO, A. L. P.; OLIVEIRA, T. B.; FERRI, P. H.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. de P. Avaliação da composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de Aloysia gratissima (Gillies & Hook) Tronc. (Alfazema), Ocimum gratissimum L. (Alfavaca-cravo) e Curcuma longa L. (Acafrão). **Revista eletrônica de Farmácia.** v. IV. 2007.

GAZIM, Z. L.; AMORIM, A. C. L.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M.; NASCIMENTO, I. A.; FERREIRA, G. A.; CORTEZ, D. A. G. Seazonal Variation, Chemichal Composition, and analgesic and antimicrobrial activities of the Essential Oil from Leaves of tetradenia riparia (Hochst) codd in Southern Brazil. **Molecules**, 2010. 15.5509-5524, doí 10.3390/**molecules**15085509.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 12, p. 3864 - 3868, 1991. **Biological Sciences**, v. 3 (1), p. 60-64, 2013.

HASTENRATH, S. 1984: Interannual variability and annual cycle: mechanisms of circulation and climate in the tropical Atlantic. **Mon. Wea. Rev**., n.112, p.1097-1107.

KONRATH, E. L.; PASSOS, C. S.; KLEIN-JR, L. C.; HENRIQUES, **A.J. Pharm. Pharmacol.,** v. 65, p. 1701. 2013.

KUTCHAN, T. M. Curr. Opin. **Plant Biol**., v. 8, p. 292. 2005.

LEE D. W.; OBERBAUER, S. F.; JOHNSON, P.; KHIRNAPILAY, B.; MANSOR, M.; MOHAMAD, H.; YAP, S.K. 2000. Effects of irradiance and espectros quality on leaf structure and function in seedlings of two southeast aian Hopea (Diptenocarpeceae) species**. American Jornaul of Botany** 87:477-455.

LIMA, J. M.; SILVA, C. A.; ROSA, M. B.; SANTOS, J. B.; OLIVEIRA, T. G. e SILVA, M. B. Prospecção fitoquímica de Sonchus Oleraceus e sua toxicidade sobre o microcrustáceo Artemia salina. **Planta daninha**, Viçosa-Mg; v.27, n.1, p,7-11, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002, 512p.

MATOS, F. J. de A**. Introdução à Fitoquímica Experimental**. 3. ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, L. B.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: a conveniente general bioassay for aactive plant constituents. J. **Med. Plant.** Res., 1982; 45: 31,4.

MIYAZAWA, M.; WATANABE, H.; KAMEOKA, H. Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by Monoterpenoids with a p-Menthane Skeleton. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 677-679, 1997.

MORAES, L. A. S.; CASTANHA, R. F., CATINI, 2012. Caracterização química do óleo essencial da Alfazema do Brasil coletada em Paty de Alferes – Rio de Janeiro**. Horticultura Brasileira** 30: S2183-S2188.

NASCIMENTO, J. E.; MELO, A.F.M.; LIMA E SILVA, T. C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS E. M.; ALBURQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente as larvas de Artemia salina Leach. de três espécies medicinais do gênero Phyllanthus (Phyllanthaceae). **Rev. Cienc. Farm. Básica** A. pl., v.29, n.2, p.145-150, 2008.

NUNES, L. C. C.; GALINDO, A. B.; DEUS, A.S.O.; RUFINO.A.R.; RANDAU, K.P.; XAVIER, H. S.; CITO, A. M. G. L. Variabilidade Sazonal de Constituintes de Própolis Vermelha e Bioatividade de artemia salina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 19(2B): 524-529, Abr/Jun/ 2009.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18 (2), p. 301-307, 2008.

PAULUS et. al. Teor e composição química de óleo essencial de Cidró em função da sazonalidade e horário da colheita. **Horticultura Brasileira**. V.31, n.2, p. 203-209, 2013.

PEREIRA, E. M.; COSTA, R. T. R.V.; COSTA, F. B.; FERREIRA, A.A.; ARAÚJO, H. G.; ARAÚJO, A. S.; CAVALCANTI, M. T. Avaliação microbiológica e toxicológica de broto de palma inteiro e minimamente processado. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA**, 52. Anais... Salvador: ABH, 2012.

PINTO, J. E. B. P.; CARDOSO, J. C. W.; CASTRO, E. M.; BERTOLUCCI, S. K.; MELO, L. A.; DOUSSEAU, S. Aspectos morfofisiológicos e conteúdo de óleo essencial de plantas de alfazema-do-Brasil em função de níveis de sombreamento. **Horticultura Brasileira,** v. 25, p.210-214. 2007.

RADÜNZ, L. L.; MELO, E. C.; BERBERT, P. A.; DE GRANDI, A. M.; ROCHA, R. P.; Efeito da temperatura de secagem na quantidade e qualidade do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham). **XXX Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola – CONBEA**, Foz do Iguaçu - Paraná, 31 de julho a 03 de agosto de 2001.

RICCIARDI, G. A. L.; VEGLIA, J.; RICCIARDI, A. I. A.; BANDONI, A. L. Examen de los aceites esenciales de especies de Aloysia (Verbenaceae) del Nordeste. **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas,** v. 8, p. 100-102. 2000.

RICCIARDI, G. A. L.; VAN BAREN, C. M.; DI LEOLIRA, P.; RICCIARDI, A. I. A..; LORENZO, D.; DELLACASA, E.; BANDONI, A. L. Volatilie Constituintes from aerial parts of aloysia gratissima (Gillies & Hook) Tronc Var gratissima growing in corrrientes, Argentina. **Flavour and Fragrance Journal**. V.21, nº 4, p. 698-703, 2005.

RICCIARDI, G. A. L.; VAN BAREN, C. M.; LIRA, P.; DI, L. E. O.; RICCIARDI, A. I. A.; LORENZO, D.; DELLACASSA, E.; BANDONI, A. L. Volatile constituents from aerial parts of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. var. gratissima growing in Corrientes, Argentina. **Flavor and Fragrance Journal**, v. 21, p. 698-703. 2006**.**

SALIMENA, F.R.G. et al. **Verbenaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Disponível em : <http:// floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB246> Acesso em: 01 Abr. 2013.

SANTOS, M.C dos. **Formação continuada para professores de ciências biológica e o ensino sobre o bioma caatinga**. 2013. 183. Dissertação (Mestrado em Educação Científica e Formação de Professores do Programa de pós-graduação) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, 2013.

SANTOS, F. M. dos. **Aspectos ecofisiológicos de Aloysia gratissima (Gillies et Hook) Trancoso (Verbenaceae) associados a composição do oleo essencial e sua ação antimicrobriana.** 2007. 116p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SANTOS, A. C. B.; NUNES, T. S.; COUTINHO, M. A. P. Uso Popular de Espécies Medicinais da Família Verbenaceae no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v.17, n.4, supl.II, p.980-991, 2015.

SANTOS, F. M.; PINTO, J. E. B. P.; ALVARENGA, A. A.; OLIVEIRA, A. A.; OLIVEIRA, L.P. Produção de Mudas de Aloysia gratissima (Gillies & Hook) Tronc. Por meio da propagação sexuada e assexuada. **Revis. Bras. De Pl. Med**., Botucatu, v.11, n.2, p. 130-136, 2009.

SAVELEV, S.; OKELLO, E.; PERRY, N. S. L.; WILKINS, R. M.; PERRYE.K. **Pharmacol. Biochem**. Behav. v. 75, p. 661. 2003.

SILVA, L. V.; CONSTANCIO, S. C. M.; MENDES, M. F.; COELHO, G. L. V. Extração do óleo essencial da pimenta rosa (*Schinus molle*) usando hidrodestilação e soxhlet. **Anais do VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica.** UNICAMP – 2005.

SIMÕES, Claudia M. O.; SCHENKEL, Eloir Paulo.; GOSMANN, Grace. MELLO, J. Carols P.; MENTZ, Lilian A.; PETRORICK, Pedro R.: **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 3ª edição. Porto Alegre, SC: Editora da UFSC, 2001. 1102p.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.; **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora UFRGS, Porto Alegre, 6.ed, 2007, p. 1104.

SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G.; Estudo fitoquímico de Unonopsis Lindmanh- Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a artemia salina Leach. **Química Nova**, 21(5), 1998.

SOLER, E.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. 1986. Composition of Aloysia gratissima leaf essential oil. **Phytochemistry**, 25 (6), p. 1343-1345.

SOUZA, A.A. ; WIEST, J.M.; Atividade anti-bacteriana de Aloysia gratissima (Gill et Hook) Tronc. (garupá, ervasanta), usada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul – Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.9, n.3, p.23-29, 2007.

SOUZA, A. de.; LOPES, E. M. C.; SILVA, M. C. da, CORDEIRO, I.; Young, M. C. M.; Sobral, M. E. G.; Moreno. P. R. H. Chemical composition and acetylcholinesterase inhibitory activity of essential oils of Myrceugenia myrcioides (Cambess.) O. Berg and Eugenia riedeliana O. Berg, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 20(2): 175-179, Abr./Mai. 2010.

TAVEIRA, F. S. N.; LIMA, W.N.; ANDRADE, E. H..A.; MAIA, J. G. S. Seazonal Essential oil variation of Aniba Canelilla. **Biomedichal Systematics and Ecology** v. 31, p. 69-75. 2003.

TEIXEIRA, A. de O. **Identificação e Quantificação de Voláteis de Lippia Thymoides por GC-FID Utilizando Fatores de Respostas Previstos**. 2018. 27p. Dissertação de Mestrado (Química Analítica), UESB, Jequié, 2018.

TISSOT, E.; ROCHAT, S.; DEBONNEVILLE, C.; CHAINTREAU, A. Rapid GC-FID quantification technique without authentic samples using predicted response factors. **Flavour Fragrance Journal**. v. 27, p. 290–296. 2012.

TREVESIAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para o tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, Vol. 26, Nº 3, 301-304, 2003.

THOMAS, E. **Caracterização química, atividade citotóxica e genotóxica do óleo essencial de espécies de Aloysia Paláu (Verbenaceae) do Rio Grande do Sul**. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul. 2015.

TROVATI, G.; SANCHES, E. A.; GALHIANE, M.S.; CHIERICE, G.O. Essential oil composition of Aloysia gratissima from Brazil**. Journal of Essential Oil Research**, v. 21, p. 325-326. 2009.

VANDRESEN F.; SCHMITT. E.; KATO. L.; OLIVEIRA CMA.; AMADO. CAB.; SILVA. CC. Constituintes químicos e avaliação das atividades antibacteriana e antiedermatogênica de Aloysia gratissima (Gillies & Hook.) Tronc. Aloysia virgata (Ruiz & Pav.) Pers., Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 20, n. 3, p. 317-321. Jun.-Jul. 2010.

## Referências Eletrônicas (Sites)

https://pt.weatherspark.com/y/30894/Clima-caracter%C3%ADstico-em-Jequi%C3%A9-Brasil-durante-o-ano

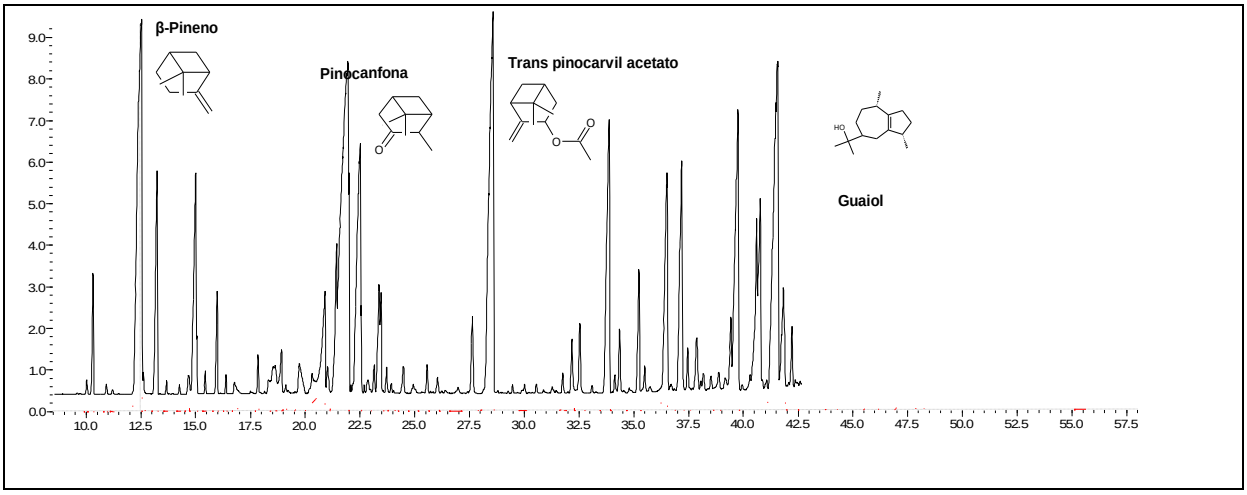
http://sinda.crn2.inpe.br/PCD/SITE/novo/site/index.php (INPE)

https://www.abc-distancias.com/distancia/3459943-3453357/Jequie/Poco-Dantas/

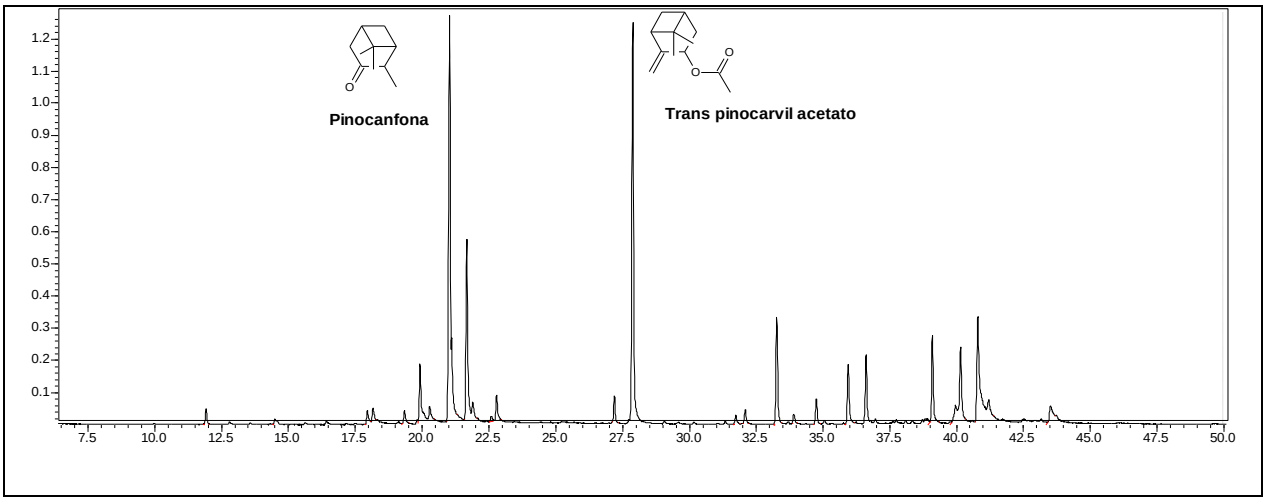
# APÊNDICES

# DADOS SUPLEMENTARES

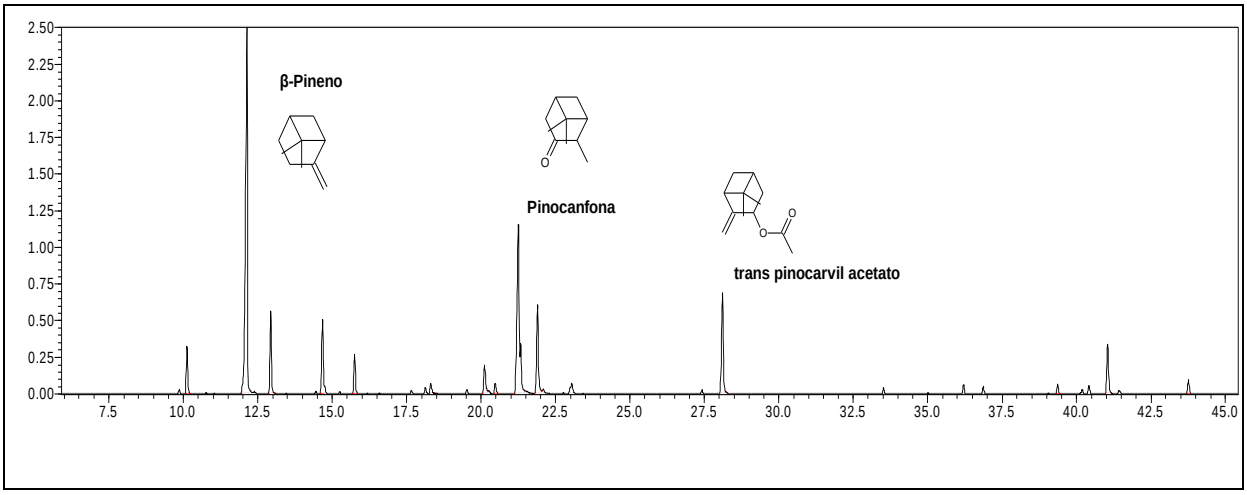
**Apêndice A:** Cromatogramas de íons Totais (TIC). Extração referente ao mês de **Out/15**.



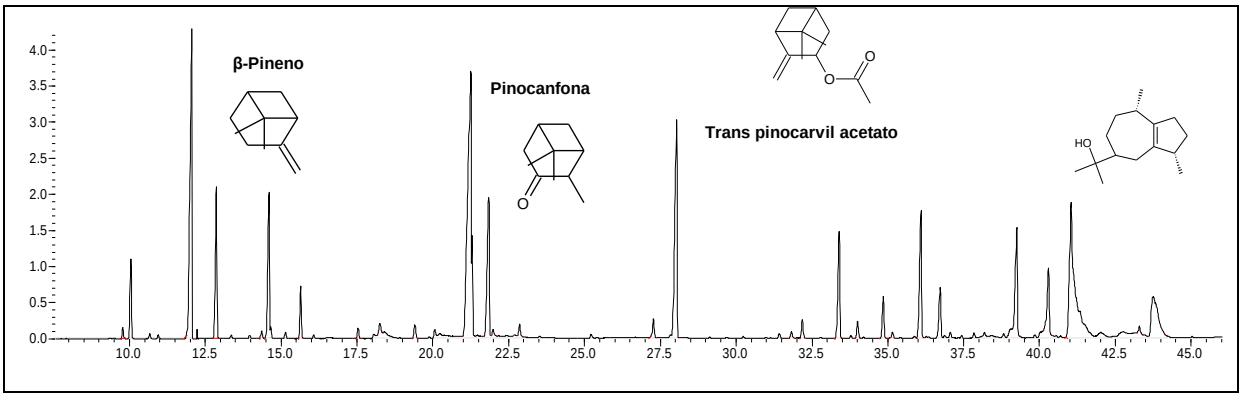

**Apêndice B:** Cromatogramas de íons Totais (TIC). Referente ao mês de **Nov/16**.



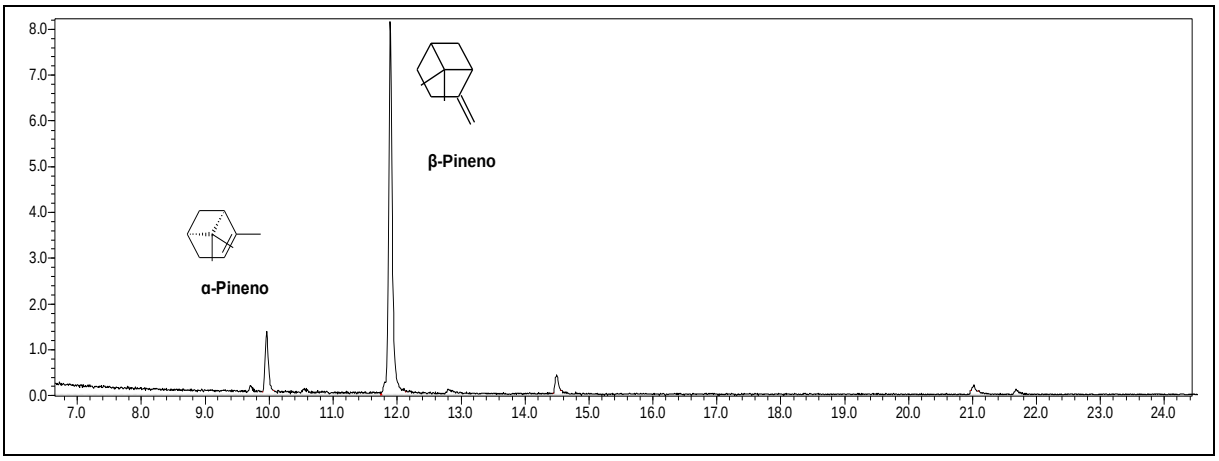

**Apêndice C:** Cromatogramas de íons Totais (TIC). Referente ao mês de **Abr/16.**



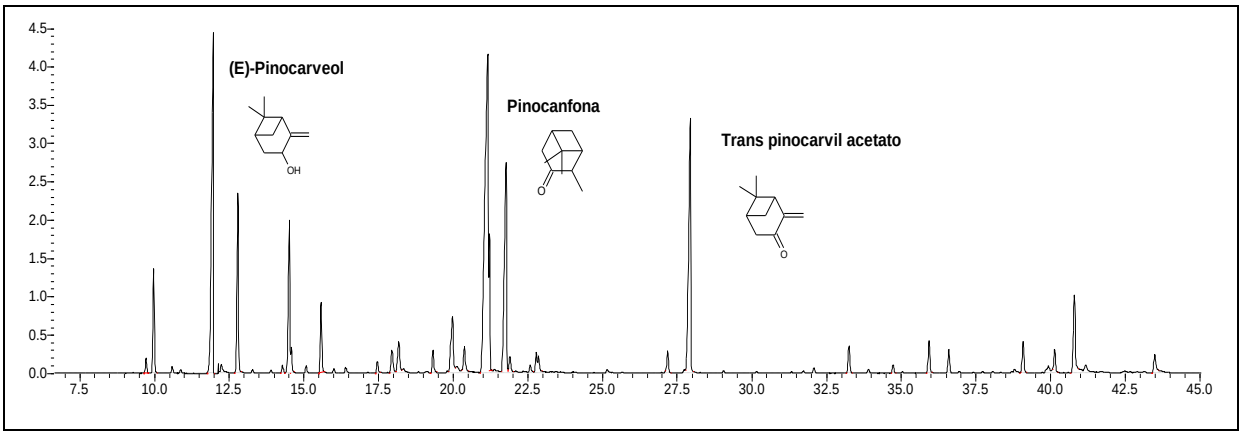
**Apêndice D:** Cromatogramas de íons Totais (TIC). Referente ao mês de **Ago/16.**



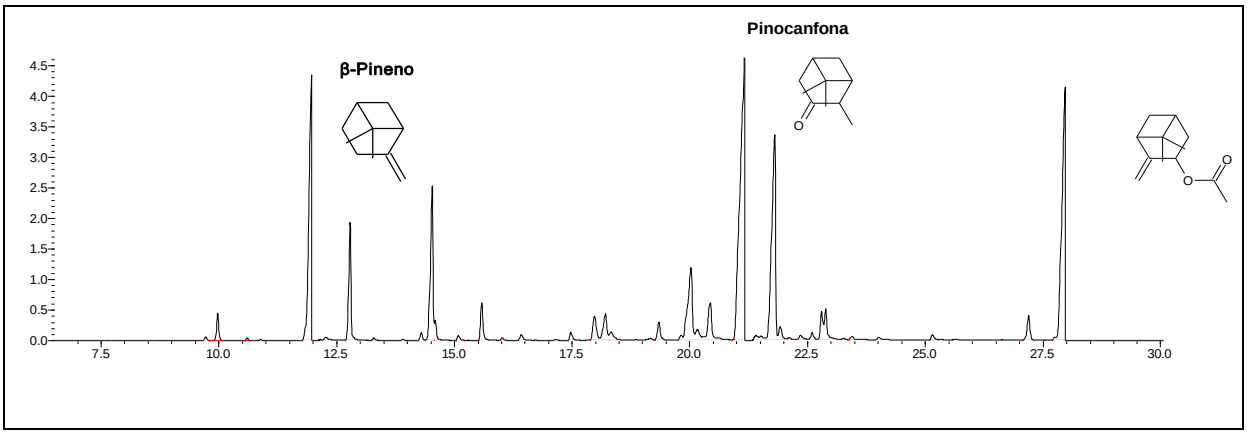

**Apêndice E:** Cromatogramas de íons Totais (TIC). Referente ao mês de **Mai/17.**




**Apêndice F:** Cromatogramas de íons Totais (TIC). Referente ao mês de **Jun/17.**

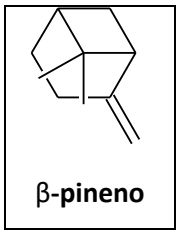


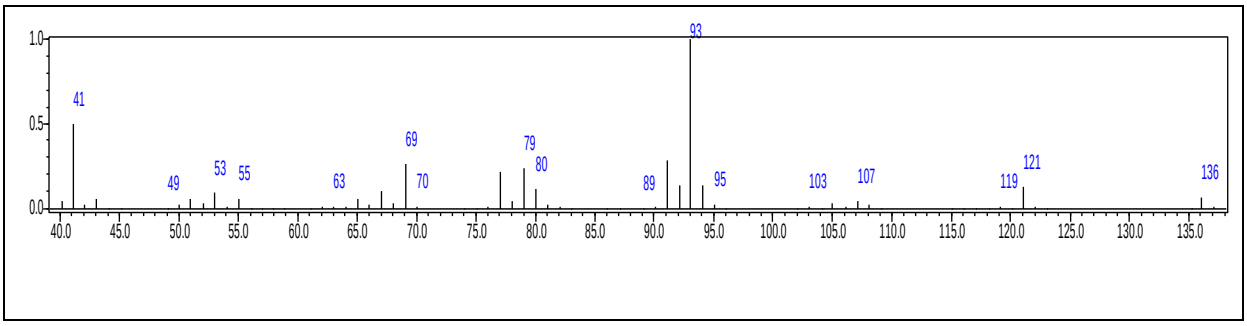
**Apêndice G:** Cromatogramas de íons Totais (TIC). Referente ao mês de **Ago /17**.



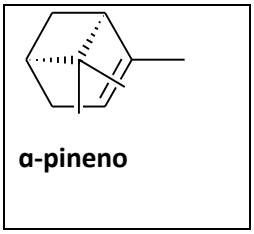

## Espectro de massas de constituintes majoritários de *A. gratissima*

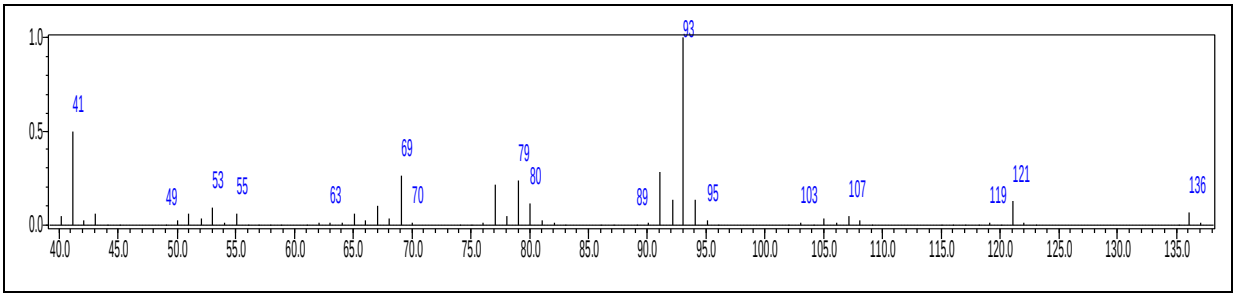
**Apêndice H:** Espectro de massas referente ao β-pineno.



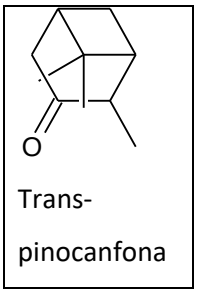



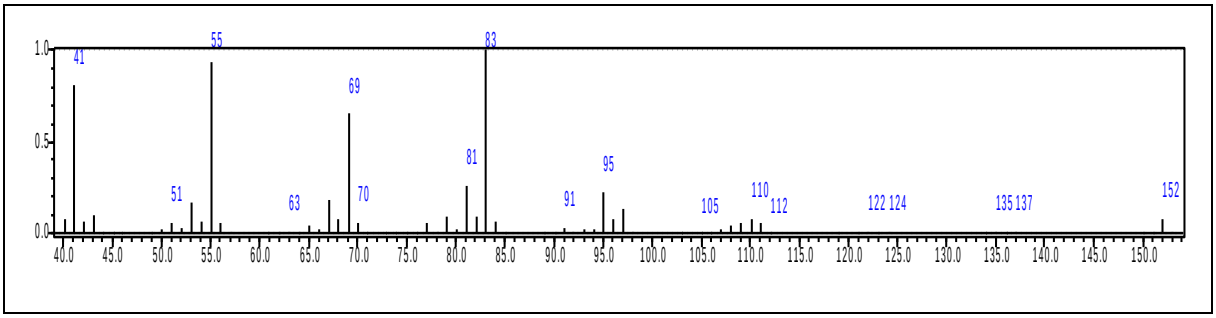
**Apêndice I:** Espectro de massas referente ao α-pineno



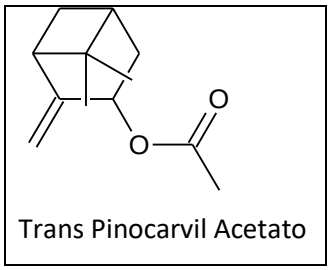



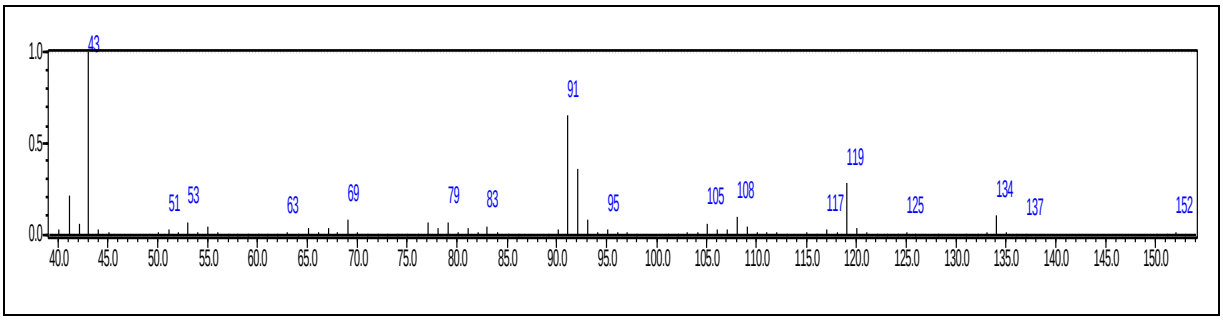

**Apêndice J:** Espectro de massas referente à Pinocanfona

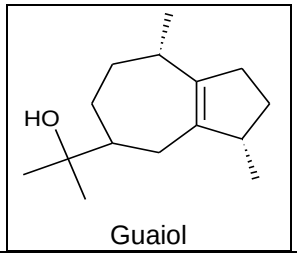
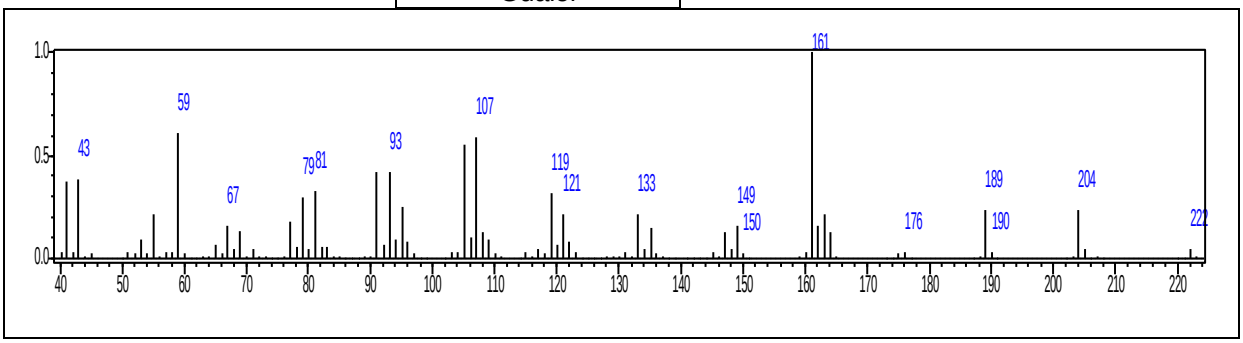


**Apêndice L:** Espectro de massas referente ao Trans pinocarvil acetato




**Apêndice M:** Espectro de massas referente ao Guaiol