



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**CONSTITUINTES QUÍMICOS DE ÓLEOS VOLÁTEIS
DE PLANTAS MEDICINAIS DO SUL DO BRASIL:
ISOLAMENTO, DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E
ATIVIDADE BIOLÓGICA**

TESE DE DOUTORADO

CAROLINA QUATRIN OLIVEIRA

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**CONSTITUINTES QUÍMICOS DE ÓLEOS VOLÁTEIS DE PLANTAS MEDICINAIS
DO SUL DO BRASIL: ISOLAMENTO, DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E
ATIVIDADE BIOLÓGICA**

por

Carolina Quatrin Oliveira

Tese apresentada ao Curso de doutorado do Programa de
Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em
Química Orgânica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Química.

Orientador: Ademir Farias Morel

Santa Maria, RS, Brasil

2012

Universidade Federal de Santa Maria
Programa de Pós-Graduação em Química

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**CONSTITUINTES QUÍMICOS DE ÓLEOS VOLÁTEIS DE PLANTAS MEDICINAIS
DO SUL DO BRASIL: ISOLAMENTO, DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E
ATIVIDADE BIOLÓGICA**

elaborada por

Carolina Quatrin Oliveira

como requisito parcial para obtenção do grau de
doutor em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Ademir Farias Morel
(Orientador-UFSM)

Prof. Dr. Eduardo Miranda Ethur
(UNIVATES)

Profª Drª Ionara Irion Dalcol
(UFSM)

Prof. Miguel Soriano Balparda Caro
(UFSC)

Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto
(UFSM)

Santa Maria, 04 de maio de 2012

Aos meus pais Luiz Carlos e Geni e
aos meus irmãos Luisa e Henrique:
Obrigada por todo amor, carinho, apoio,
compreensão e incentivo dedicados sempre.
Sem vocês eu não seria nada!

A todos os meus tios e tias, primos e primas que sempre me
apoiaram incentivaram e ajudaram neste trabalho

Ao Junior, meu esposo, sempre ao meu lado
Obrigada pela
tua paciência, ajuda e incentivo!
Eu te amo muito!

Ao Prof. Dr. Ademir Farias Morel, pela
orientação, incentivo, compreensão, paciência e
amizade durante todos esses anos de convívio.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Ionara I. Dalcol, pela amizade, convívio, incentivo e apoio durante a realização deste trabalho.

Aos Profs. Eduardo Miranda Ethur, Bernardo Baldisserotto e Miguel Soriano Balparda Caro pelas contribuições e disposição em fazerem parte da banca da examinadora deste trabalho.

Aos Profs. Ubiratan F. da Silva e Marco Aurelio Mostardeiro pela amizade, sugestões e por fazer parte da banca de qualificação.

Aos meus ICs: Alessandra, Ananda, Marcelo Pedroso pela ajuda, convívio, amizade.

Aos colegas e amigos de tantos anos de laboratório (NPPN): Vinícius, Tanize, Janice, Gabriele, Patrícia, Caroline, Lisiane, Luciana, Nalin, Ilaine, Susi, Graci Zanon, Marcelo, Alexandre, Clarice, Euclésio, Gilvan, Graci Maldaner, Juliano, Sandro, Enrique, Vanessa e Andréia pela amizade, auxílio e companheirismo durante tantos anos.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da UFSM, em especial ao Ademir e a Valéria, pela amizade, empenho e atenção prestada. Obrigada.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada.

Aos órgãos financiadores: CNPq e CAPES, pelas concessões de bolsas que viabilizaram a execução deste trabalho.

RESUMO

Titulo: Constituintes Químicos de Óleos Voláteis de plantas Medicinais do Rio Grande do Sul: Isolamento, Determinação Estrutural e Atividade Biológica.

Autor: Carolina Quatrin Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

Os óleos essenciais de seis espécies de plantas nativas do sul do Brasil foram obtidos através de hidrodestilações e analisados quanto suas composições químicas, atividades antimicrobianas e potencial antioxidante. As espécies selecionadas para este estudo foram: *Calea clematidea* (Asteraceae), *Acanthospermum australe* (Asteraceae), *Tagetes minuta* (Asteraceae), *Julocroton humilis* (Euphorbiaceae), *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) e *Nectandra lanceolata* (Lauraceae). Neste trabalho, os óleos voláteis de cada espécie foram submetidos a procedimentos cromatográficos visando o isolamento de seus constituintes em suas formas puras. As análises estruturais dos componentes isolados puros foram realizadas através de técnicas cromatográficas, obtenção dos respectivos índices de retenção de Kovats, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C utilizando-se de técnicas uni- e bidimensionais. Desta forma, identificaram-se dois componentes sesquiterpênicos inéditos como componentes do óleo essencial de *Nectandra megapotamica*, denominado neste trabalho de PF1 e PF2. Do óleo essencial de *Acanthospermum australe* foi isolado o seu principal constituinte, uma mistura de Carvacrol isobutirato e Timol isobutirato. Finalmente, os óleos essenciais obtidos, assim como os componentes isolados através de métodos cromatográficos, foram testados quanto as suas possíveis atividades antimicrobianas. Para isso foi utilizado o método de Microdiluição em caldo (CIM), através do qual se observou que os óleos analisados foram ativos contra a maioria dos microorganismos utilizados. Os resultados, entre 6,5 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), mostraram que a PF1 e PF2 têm uma excelente atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados. Além disso, a atividade antioxidante foi realizada pelo método DPPH, que é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes. De uma maneira geral, os óleos essenciais de *Acanthospermum australe* apresentaram atividade antioxidante moderada.

ABSTRACT

Title: Chemical Constituents of Volatile Oils from Medicinal Plants of South Brasil: Isolation, Structural Determination, Structural Modification and Biological Activity.

Author: Carolina Quatrin Oliveira

Academic Advisor: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

The essential oils of six species of plants wild in south Brazil, were investigated as for its chemical composition, antibacterial activity and antioxidant potential. The selected species for this study were *Calea clematidea* (Asteraceae), *Acanthospermum australe* (Asteraceae), *Tagetes minuta* (Asteraceae), *Julocroton humilis* (Euphorbiaceae), *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) e *Nectandra lanceolata* (Lauraceae). In this work, the essential oil of each specie was submitted to chromatographic procedures to isolate its constituents in pure form. The structural determination of isolated components were realized through chromatographic technics, obtainment of Kovats indices, GC-MS and RMN of ^1H and ^{13}C uni- and bi dimensional. So that, were possible to identify two inedited sesquiterpenes of essential oil from *Nectandra megapotamica* denominated in this work as PF1 and PF2. From essential oil of *Acanthospermum australe* were isolated its principal constituent, the mix of Carvacrol isobutirate and Timol isobutirate. In conclusion, the essential oil obtained as well as, the isolated components through chromatographic methods were submitted to antibacterial and antifungal tests, using the microdilution methods, through which is possible to observe that the essential oils were active against a greater number of microorganisms. The results, between 6,5 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, showed that the PF1 and PF2 have a excellent antimicrobial activity against the tested microorganisms. Furthermore, the antioxidant activity was accessed by the reducing power assay, the scavenging effect on DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radicals model system. In a general way, the essential oils from *Acanthospermum australe* presented moderate antioxidant activity.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Titulo: Chemical Constituents of Volatile Oils from Medicinal Plants of Rio

Grande do Sul: Isolation, Structural Determination, Structural Modification and Biological Activity.

Author: Carolina Quatrin Oliveira

Academic Advisor: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

PhD Tesis in Organic Chemistry

Santa Maria, may, 2012

Listagem de Figuras

Figura 1. <i>Calea clematidea</i>	32
Figura 2. Estrutura do caleol	32
Figura 3. <i>Acanthospermum australe</i>	35
Figura 4. <i>Tagetes minuta</i>	37
Figura 5. <i>Julocroton humilis</i>	41
Figura 6. Julocrotina, alcaloide isolado de <i>Julocroton humilis</i>	42
Figura 7. <i>Nectandra megapotamica</i>	44
Figura 8. <i>Nectandra lanceolata</i>	46
Figura 9. Estrutura da glaziovina.....	46
Figura 10. Rota biossintética do mevalonato (a) rota independente do mevalonato (deoxixilose fosfato) (b) para a biossíntese do isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP). O fosfato livre é destacado em vermelho e as flechas mais largas indicam passos que ainda não foram identificados. (MAHMOUND; CROTEAU,2002)	52
Figura 11. Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas. Fonte: Adaptado de Gobbo-Neto; Lopes, 2007	55
Figura 12. Modelo para avaliação da atividade antioxidante utilizando DPPH.....	59
Figura 13. Aparelho de Clevenger modificado, utilizado na extração dos óleos essenciais.	68
Figura 14. Síntese do timol metil éter	71
Figura 15. Perfil cromatográfico do óleo dos caules de <i>C. clematidea</i> . (A). Perfil cromatográfico do óleo dos caules de <i>C. clematidea</i> ampliação até 29 minutos (B). Perfil cromatográfico do óleo do caule de <i>C. clematidea</i> ampliação depois de 29 minutos (C). Utilizando coluna DB5, CCSF de 25 m. Programa de análise: T _{inicial} = 50 °C, T _{final} = 250 °C, rampa de 4 °C min ⁻¹	83
Figura 16. Perfil cromatográfico do óleo das cascas das raízes de <i>C. clematidea</i> (A). Perfil cromatográfico do óleo do caule de <i>C. clematidea</i> ampliação (B). Utilizando coluna DB5, CCSF de 25 m. Programa de análise: T _{inicial} = 50 °C, T _{final} = 250 °C, rampa de 4°C min ⁻¹	84
Figura 17. Cromatograma do Timol metil éter padrão (em azul), do óleo dos caules de <i>C. clematidea</i> (em preto) e da coinjeção dos mesmos (em rosa).....	85

Figura 18. Cromatograma com a comparação entre óleo das raízes de <i>C. clematidea</i> (em rosa) e a coinjeção com o padrão timol metil éter (em preto).....	85
Figura 19. Perfil cromatográfico do produto sintético Timol metil éter (A). Espectro de massas do produto sintetizado (B). Comparação com o espectro de massa da biblioteca do aparelho CG-EM (C).....	86
Figura 20. Principais constituintes de <i>C. clematidea</i>	88
Figura 21. Atividade antioxidante de amostras de <i>C. clematidea</i> . BHT: Butil hidroxi Tolueno (padrão), O Raízes: Óleo das cascas das raízes, O. Folhas: Óleo das folhas, O. Caules: Óleo dos caules, O. Flores: Óleo das flores.....	89
Figura 22. Perfil cromatográfico do óleo das raízes de <i>A. australe</i> de Santa Maria (A). Perfil cromatográfico do óleo das partes aéreas de <i>A. australe</i> Santa Maria (B). Utilizando coluna 5MS, CCSF de 25 m. Programa de análise: Tinicial= 50 °C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4 °C min ⁻¹	94
Figura 23. Perfil cromatográfico do óleo das partes aéreas de <i>A. australe</i> da amostra de Três de Maio (A). Continuação do perfil cromatográfico do óleo das partes aéreas de <i>A. australe</i> da amostra de Três de Maio (B). Utilizando coluna 5MS, CCSF de 25 m. Programa de análise: = 50 °C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4 °C min ⁻¹	95
Figura 24. Perfil cromatográfico do óleo das raízes de <i>A. australe</i> da amostra de Frederico Westphalen (A) Continuação do perfil cromatográfico do óleo das raízes de <i>A. australe</i> da amostra de Frederico Westphalen (B). Utilizando coluna 5MS, CCSF de 25 m. Programa de análise: Tinicial= 50 °C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4 °C min ⁻¹	96
Figura 25. Perfil cromatográfico do óleo das partes aéreas de <i>A. australe</i> da amostra de Frederico Westphalen (A). Continuação do perfil cromatográfico do óleo das partes aéreas de <i>A. australe</i> da amostra de Frederico Westphalen (B). Continuação do perfil cromatográfico do óleo das partes aéreas de <i>A. australe</i> da amostra de Frederico Westphalen (C) Utilizando coluna 5MS , CCSF de 25 m. Programa de análise: Tinicial= 50 °C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4 °C min ⁻¹	97
Figura 26. Perfil cromatográfico do óleo das raízes de <i>A. australe</i> da amostra de Três de Maio (A). Continuação do perfil cromatográfico do óleo das raízes de <i>A. australe</i> da amostra de Três de Maio (B). Utilizando coluna 5MS , CCSF de 25 m. Programa de análise: Tinicial=50 °C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4 °C min ⁻¹ ..	98

Figura 27. Perfil cromatográfico da fração isolado AaFr2 das folhas de <i>A.australe</i> . A coluna utilizada é a 5MS , CCSF de 25 m. Programa de análise: Tinicial= 50°C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4°C min ⁻¹	101
Figura 28. Perfil cromatográfico da mistura de terpenos isolado AA1 das folhas de <i>A.australe</i> . A coluna utilizada é a 5MS, CCSF de 25 m. Programa de análise: Tinicial= 50°C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4°C min-1.....	102
Figura 29. Espectro de massas da mistura majoritária do óleo das folhas de <i>A. australe</i>	102
Figura 30. Espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz em CDCl ₃ , da mistura de majoritários de <i>A. australe</i>	103
Figura 31. Expansão do espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz em CDCl ₃ , da mistura de majoritários de <i>A. australe</i>	104
Figura 32. Expansão do espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz em CDCl ₃ , da mistura de majoritários de <i>A. australe</i>	105
Figura 33. Espectro de RMN de ¹³ C a 400 MHz em CDCl ₃ , da mistura de majoritários de <i>A. Australe</i>	106
Figura 34. Espectro de RMN de ¹³ C DEPT-135 em CDCl ₃ , da mistura de <i>A australe</i>	107
Figura 35. Espectro de COSY da mistura dos majoritários de <i>A australe</i> , em CDCl ₃ , a 400 MHz.	108
Figura 36. Espectro ampliado de COSY da mistura dos majoritários de <i>A australe</i> , em CDCl ₃ , a 400 MHz.....	109
Figura 37. Espectro ampliado de COSY da mistura dos majoritários de <i>A australe</i> , em CDCl ₃ , a 400 MHz.....	110
Figura 38. Proposta estrutural de sesquiterpenos isolados como uma mistura do óleo essencial de <i>A. australe</i> , 1) Timol isobutirato, 2) Carvacrol isobutirato. Para tornar a comparação entre as duas estruturas mais didática a numeração do composto Carvacrol isobutirato (2) não foi iniciada no carbono de maior prioridade, que deveria ser o do grupo isobutirato.....	110
Figura 39. Comparação dos perfis cromatográficos da fração AaFr2 das folhas de <i>A.australe</i> (A). e a mesma fração AaFr2 após a reação de hidrólise (AaSMra hidrolisado) (B). A coluna utilizada é a 5MS, CCSF de 25 m. Programa de análise: Tinicial= 50°C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4°C min ⁻¹	112

Figura 40. Atividade antioxidante das amostras: BHT- Butil hidroxi tolueno (padrão), AaFWra (amostra de Frederico Westpahlen), Aa TM ra (amostra de Três de Maio), AaSMra (amostra de Santa Maria).	113
Figura 41. Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de <i>T. minuta</i> , coletada em Florianópolis-SC . A coluna utilizada é a DB5 de 25 m. Programa de análise: Tinicial= 50 °C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4 °C min ⁻¹	119
Figura 42. Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de <i>T. minuta</i> , coletada em Livramento CN. A coluna utilizada é a DB5 de 25 m. Programa de análise: Tinicial= 50 °C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4 °C min ⁻¹	120
Figura 43. Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de <i>T. minuta</i> coletada em Livramento SN A coluna utilizada é a DB5 de 25 m. Programa de análise: Tinicial= 50 °C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4 °C min ⁻¹	120
Figura 44. Perfil cromatográfico da fração 9 da coluna do óleo essencial das partes aéreas de <i>T. minuta</i> CN , coletada em . A coluna utilizada é a DB5 de 25 m. Programa de análise: Tinicial= 50 °C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4 °C min ⁻¹	122
Figura 45. Espectro de RMN de ¹³ C a 400 MHz em CDCl ₃ , do monoterpene Diidrotagetona isolado de <i>T. minuta</i>	123
Figura 46. Espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz em CDCl ₃ , do monoterpene diidrotagetona.	124
Figura 47. Estrutura do componente majoritário diidrotagetona isolado de <i>T. minuta</i> SN.....	124
Figura 48. Perfil cromatográfico do óleo das partes aéreas de <i>J.humilis</i> de 2008 (Jh08). Utilizando coluna DB5, CCSF de 25 m. Programa de análise: Tinicial= 50 °C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4 °C min ⁻¹	129
Figura 49 Perfil cromatográfico do óleo das partes aéreas de <i>J.humilis</i> de 2010 (Jh10). Utilizando coluna 5SM, CCSF de 25 m. Programa de análise: Tinicial= 50 °C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4 °C min ⁻¹	130
Figura 50. Perfil cromatográfico do óleo das partes aéreas de <i>J.humilis</i> de 2008 que foi reavaliado em 2010 (Jh08d). Utilizando coluna 5MS, CCSF de 25 m. Programa de análise: Tinicial= 50 °C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4 °C min ⁻¹	130
Figura 51. Germacreno A, terpeno majoritário de Jh10 e Jh08.....	132
Figura 52. Espatuleno, terpeno majoritário de Jh08d.....	132
Figura 53. Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de <i>N. megapotamica</i> , coletada no primavera (A). A coluna utilizada é a DB5, CCSF de 25 m. Programa	

de análise: Tinicial= 50 °C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4 °C min ⁻¹ , aparelho 3400.	138
Figura 54. Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de <i>N. megapotamica</i> , coletada no verão (B). A coluna utilizada é a 5MS, CCSF de 25 m. Programa de análise: Tinicial= 50 °C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4 °C min ⁻¹	139
Figura 55. Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de <i>N. megapotamica</i> , coletada no verão e reanalisada um ano e dois meses depois para verificação de degradação (Bd). A coluna utilizada é a 5MS, CCSF de 25 m. Programa de análise: Tinicial= 50 °C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4 °C min ⁻¹ , aparelho 3400..	139
Figura 56. Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de <i>N. megapotamica</i> , coletada no outono (C). A coluna utilizada é a DB5, CCSF de 25 m. Programa de análise: Tinicial= 50 °C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4 °C min ⁻¹ , aparelho 3400.	140
Figura 57. Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de <i>N. megapotamica</i> , coletada no inverno(D). A coluna utilizada é a 5MS, CCSF de 25 m. Programa de análise: Tinicial= 50 °C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4 °C min ⁻¹	140
Figura 58. Perfil cromatográfico de NmFr3 retirada do óleo essencial das folhas de <i>N. megapotamica</i> . A coluna utilizada é a DB5, CCSF de 25 m. Programa de análise: Tinicial= 50 °C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4 °C min ⁻¹ , aparelho 3400..	144
Figura 59. Espectro de RMN ¹³ C a 400 MHz em CDCl ₃ de NmFr3 da coluna de isolamento do componente majoritário de <i>N. megapotamica</i>	145
Figura 60. Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de <i>N. megapotamica</i> , após reação de acetilação. A coluna utilizada é a DB5, CCSF de 25 m. Programa de análise: Tinicial= 50°C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4 °C min ⁻¹ , aparelho CP3800.....	146
Figura 61. Perfil cromatográfico do terpeno isolado (PF1) das folhas de <i>N.</i> <i>megapotamica</i> após a reação de acetilação. A coluna utilizada é a DB5, CCSF de 25 m. Programa de análise: Tinicial= 50°C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4°C min ⁻¹	147
Figura 62 Perfil cromatográfico do terpeno isolado (PF2) das folhas de <i>N.</i> <i>megapotamica</i> após a reação de acetilação. A coluna utilizada é a DB5, CCSF de 25 m. Programa de análise: Tinicial= 50 °C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4 °C min ⁻¹	147

Figura 63. Espectro de massas do sesquiterpeno PF1 isolado do óleo de <i>N.megapotamica</i>	148
Figura 64. Espectro e expansões do RMN de ^1H a 400 MHz em CDCl_3 , do sesquiterpeno PF1.....	149
Figura 65. Proposta estrutural do sesquiterpeno PF1.....	150
Figura 66. Espectro de RMN de ^{13}C a 400 MHz em CDCl_3 , do sesquiterpeno PF1.	151
Figura 67 Espectro de RMN de ^{13}C DEPT-135 em CDCl_3 , do PF1, isolado de <i>N. megapotamica</i>	152
Figura 68. Espectro de HETCOR de PF1, em CDCl_3 , a 400 MHz.	153
Figura 69. Espansão 1 do espectro de HETCOR de PF1, em CDCl_3 , a 400 MHz...	154
Figura 70. Expansão 2 do Espectro de HETCOR de PF1, em CDCl_3 , a 400 MHz..	155
Figura 71. Expansão 3 do Espectro de HETCOR de PF1, em CDCl_3 , a 400 MHz..	156
Figura 72. Espectro de COSY de PF1, em CDCl_3 , a 400 MHz,	157
Figura 73. Espectro de COLOC de PF1, em CDCl_3 , a 400 MHz.....	159
Figura 74. Expansão 1 do Espectro de COLOC de PF1, em CDCl_3 , a 400 MHz. ...	160
Figura 75. Expansão 2 do Espectro de COLOC de PF1, em CDCl_3 , a 400 MHz. ...	161
Figura 76. Expansão 3 do Espectro de COLOC de PF1, em CDCl_3 , a 400 MHz....	162
Figura 77. Expansão 4 do Espectro de COLOC de PF1, em CDCl_3 , a 400 MHz. ...	163
Figura 78. Espectro de massas do sesquiterpeno PF1 isolado do óleo de <i>N,megapotamica</i>	164
Figura 79. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz em CDCl_3 , do sesquiterpeno PF2.	165
Figura 80. Espectro expansão 1 de RMN de ^1H a 400 MHz em CDCl_3 , do sesquiterpeno PF2.....	165
Figura 81. Espectro expansão 2 de RMN de ^1H a 400 MHz em CDCl_3 , do sesquiterpeno PF2.....	166
Figura 82. Espectro expansão 4 de RMN de ^1H a 400 MHz em CDCl_3 , do sesquiterpeno PF2.....	166
Figura 83. Espectro de RMN de ^{13}C a 400 MHz em CDCl_3 , do sesquiterpeno PF2.	167
Figura 84. Proposta estrutural de PF2	167
Figura 85. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT-135 em CDCl_3 , do PF2, isolado de <i>N, megapotamica</i> ,	168
Figura 86. Espectro de HETCOR de PF2, em CDCl_3 , a 400 MHz,	169

Figura 87. Expansão 1 do Espectro de HETCOR de PF2, em CDCl ₃ , a 400 MHz, .	170
Figura 88. Expansão 1 do Espectro de HETCOR de PF2, em CDCl ₃ , a 400 MHz, .	171
Figura 89. Espectro de COSY de PF2, em CDCl ₃ , a 400 MHz,	173
Figura 90. Espectro de COSY de PF2, em CDCl ₃ , a 400 MHz,	174
Figura 91. Perfil cromatográfico do extrato hexânico das folhas de <i>N. megapotamica</i> , A coluna utilizada é a DB5, CCSF de 25 m, Programa de análise: Tinicial= 50 °C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4 °C min ⁻¹ ,	175
Figura 92. A: Perfil cromatográfico da comparação entre extrato hexânico (preto) com óleo essencial (azul) das folhas de <i>N. megapotamica</i> . A coinjeção também foi realizada e está representada pela cor rosa. B: Ampliação 1. C: Ampliação 2, A coluna utilizada é a 5MS, CCSF de 25 m, Programa de análise: Tinicial= 50 °C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4 °C min ⁻¹ ,	176
Figura 93. Proposta de biossíntese dos sesquiterpenos PF1 e PF2 partindo do α- selineno.	177
Figura 94. Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de <i>N. lanceolata</i>). A coluna utilizada é a 5MS de 25 m. Programa de análise: Tinicial= 50 °C. Tfinal= 250 °C. rampa de 4 °C min ⁻¹	183
Figura 95. Perfil cromatográfico do óleo essencial dos galhos de <i>N. lanceolata</i> . A coluna utilizada é a 5MS de 25 m. Programa de análise: Tinicial= 50 °C. Tfinal= 250 °C. rampa de 4 °C min ⁻¹	183

Listagem de Esquemas

Esquema 1. Biossíntese de isoprenóides e o papel das prenil-transferases em plantas superiores. IPP: isopentenil difosfato; DMAPP: dimetilalil difosfato; GPP: geranyl difosfato; FPP: farnesil difosfato e GGPP: geranylgeranyl difosfato. (MAHMOUD; CROTEAU,2002)	49
Esquema 2. Membros representativos de várias subfamílias de monoterpenos	50
Esquema 3. Análise da atividade antioxidante com DPPH.	79

Listagem de Tabelas

Tabela 1. Exsiccatas das espécies utilizadas para o estudo dos óleos essenciais. ...	64
Tabela 2. Peso do material vegetal das diferentes partes de <i>C. clematidea</i> em diferentes épocas do ano.....	65
Tabela 3. Peso do material vegetal das diferentes partes e locais de coleta de <i>Acanthospermum australe</i>	65
Tabela 4. Peso do material vegetal dos diferentes locais de coleta de <i>Tagetes minuta</i>	66
Tabela 5. Peso do material vegetal das diferentes partes e épocas do ano de <i>N. megapotamica</i>	67
Tabela 6. Dados físicos dos óleos essenciais de <i>Calea clematidea</i>	82
Tabela 7. Comparação dos rendimentos entre os diferentes óleos essenciais de <i>C. clematidea</i> em diferentes épocas do ano.	82
Tabela 8. Comparação entre componentes dos óleos de <i>C. clematidea</i>	87
Tabela 9. Resultados de CIM, CBM e CFM para os óleos voláteis <i>C. clematidea</i>	90
Tabela 10. Siglas das amostras de <i>A. australe</i>	92
Tabela 11. Dados físicos dos óleos essenciais de <i>Acanthospermum australe</i>	93
Tabela 12. Comparação entre componentes dos óleos de <i>A. australe</i>	99
Tabela 13. Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C da mistura de majoritários.....	111
Tabela 14. Resultados de CIM, CBM e CFM para os óleos voláteis <i>A. australe</i>	115
Tabela 15. Resultados de CIM, CBM e CFM para mistura majoritária isolada de <i>A. australe</i>	116
Tabela 16. Dados físicos dos óleos essenciais de <i>Tagetes minuta</i>	118
Tabela 17. Variação da composição dos óleos voláteis das partes aéreas de <i>T. minuta</i>	121
Tabela 18. Resultados de CIM, CBM e CFM para os óleos voláteis <i>T. minuta</i>	126
Tabela 19. Comparação entre componentes dos óleos de <i>J. humilis</i>	131
Tabela 20. Resultados de CIM, CBM e CFM para os óleos voláteis <i>J. humilis</i>	134
Tabela 21. Comparação dos rendimentos entre os diferentes óleos essenciais de <i>N. megapotamica</i> em diferentes épocas do ano.	137
Tabela 22. Dados físicos dos óleos essenciais de <i>N. megapotamica</i>	137
Tabela 23. Variação da composição dos óleos voláteis das folhas de <i>N. megapotamica</i>	141

Tabela 24. Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C de PF1.....	158
Tabela 25. Correlações visualizadas no espectro de COLOC para PF1.....	163
Tabela 26. Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C de PF2.....	172
Tabela 27. Resultados de CIM. CBM e CFM para os óleos voláteis <i>N. megapotamica</i>	179
Tabela 28. Resultados de CIM. CBM e CFM para os compostos isolados de <i>N. megapotamica</i>	180
Tabela 29. Dados físicos dos óleos essenciais de <i>N. lanceolata</i>	182
Tabela 30. Constituintes dos óleos de <i>Nectandra lanceolata</i>	184
Tabela 31. Resultados de CIM. CBM e CFM para os óleos voláteis <i>N. lanceolata</i>	186

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$[\alpha]_D^{25}$	Rotação Ótica
°C	Graus Celsius
ATCC	American type culture collection
BHT	Butil Hidroxi Tolueno
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CCSF	Coluna Capilar de Sílica Fundida
CDCl_3	Clorofórmio Deuterado
CG	Cromatografia Gasosa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLM	Concentração Letal Mínima
COLOC	Correlated spectroscopy for Long range Couplings
COSY	Espectrometria de correlações – do inglês: Correlated Spectroscopy
d	Dubleto
d^{25}	Densidade
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
EM	Espectrometria de Massas
et al.	Colaboradores
FID	Detector de Ionização de Chama – do inglês: Flame Ionization Detector

g	grama(s)
HETCOR	Heteronuclear Correlation
Hz	Hertz
IK	Índice de Kovats
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	Multipeto
m/z	Relação massa/carga elétrica
min.	minuto
mL	mililitro
NA	Não Ativo
NI	Não Identificado
NPPN	Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais
OE	Óleo essencial
p/v	Peso/volume
Pág.	Página
ppm	Parte(s) por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Singleto
t	Tripleto
t.a.	Temperatura Ambiente
TFAA	Anidrido trifluoracético
TMS	Tetrametilsilano

tr	Tempo de Retenção
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume
δ	Deslocamento químico
η_d^{25}	Índice de Refração
λ	Comprimento de onda
μg	micrograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 OBJETIVOS	29
2.1 Geral	29
2.2 Específicos	29
3. REVISÃO DE LITERATURA	31
3.1 Sistemática Vegetal.....	31
3.1.1 Família Asteraceae	31
3.1.1.1 O gênero <i>Calea</i>	31
3.1.1.1.1 <i>Calea clematidea</i>	32
3.1.1.2 O gênero <i>Acanthospermum</i>	33
3.1.2.2.1 <i>Acanthospermum australe</i>	33
3.1.1.3 O gênero <i>Tagetes</i>	36
3.1.1.3.1 <i>Tagetes minuta</i>	36
3.1.2. Família Euphorbiaceae	39
3.1.2.1 Gênero <i>Croton</i>	39
3.1.2.1.1 <i>Julocroton humilis</i>	40
3.1.3. Família Lauraceae	42
3.1.3.1 Gênero <i>Nectandra</i>	42
3.1.3.1 <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez	43
3.1.3.2 <i>Nectandra lanceolata</i>	45
3.2 Óleos essenciais	47
3.2.1 Extração dos Óleos Essenciais.....	53
3.2.1.1 Enfleurage.....	53
3.2.1.2 Arraste por vapor d'água.....	53
3.2.1.3 Extração com solventes orgânicos.....	53
3.2.1.4 Prensagem (ou expressão) a frio	54
3.2.1.5 Extração com CO ₂ supercrítico	54

3.2.2	Variação sazonal dos óleos essenciais.....	54
3.2.3	Métodos cromatográficos de análise de óleos essenciais:	56
3.2.3.1	Cromatografia em camada delgada (CCD):	56
3.2.3.2	Cromatografia gasosa (CG) e espectrometria de massa (EM):	56
3.3	Atividades biológicas.....	57
3.3.1	Atividade antioxidante	57
3.3.2	Atividade antimicrobiana	59
3.3.2.1	Métodos de avaliação da atividade antimicrobiana	60
4.	PARTE EXPERIMENTAL	61
4.1	Instrumentos utilizados	61
4.1.1	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H e ¹³ C	61
4.1.2	Cromatografia Gasosa (CG)	61
4.1.3	Cromatografia Gasosa (CG) acoplada a Espectrometria de Massas (EM) ...	62
4.1.4	Aparelho de Rotação Óptica Específica, Polarímetro	62
4.1.5	Refratômetro	62
4.2	Técnicas cromatográficas	63
4.2.1	Cromatografia em coluna (CC)	63
4.2.2	Cromatografia em camada delgada (CCD) e preparativa (CCDP).....	63
4.3	Solventes e reagentes purificados	63
4.4	Identificação das plantas selecionadas para estudo	64
4.5	Coleta dos materiais vegetais	64
4.5.1	Coleta dos materiais vegetais de <i>Calea clematidea</i>	64
4.5.2	Coleta dos materiais vegetais de <i>Acanthospermum australe</i>	65
4.5.3	Coleta dos materiais vegetais de <i>Tagetes minuta</i>	66
4.5.4	Coleta dos materiais vegetais de <i>Julocroton humilis</i>	66
4.5.5	Coleta dos materiais vegetais de <i>Nectandra megapotamica</i>	67
4.5.6	Coleta dos materiais vegetais de <i>N. lanceolata</i>	67
4.7	Determinação das propriedades físicas dos óleos voláteis:.....	69
4.7.1	Polarimetria (α)	69

4.7.2 Índice de refração (η)	69
4.7.3 Densidade (d).....	69
4.8 Análise dos óleos voláteis das espécies	69
4.8.1 Determinação do índice de retenção de Kovats para os constituintes dos óleos voláteis	70
4.9 Reação para obtenção do padrão Timol metil éter para análise do óleo de <i>Calea clematidea</i>	71
4.10 Isolamento dos componentes majoritários do óleo das folhas de <i>N. megapotamica</i>	71
4.10.1 Separação dos dois compostos majoritários do óleo das folhas de <i>Nectandra megapotamica</i> contidos em NmFr3 utilizando-se TFAA.....	72
4.10.2 Preparação do extrato hexânico das folhas de <i>Nectandra megapotamica</i> .	72
4.11 Isolamento do componente majoritário dos óleos das raízes de <i>A. australe</i>	73
4.11.1 Hidrólise alcalina da mistura de Timol isobutirato e Carvacrol isobutirato (AaFr2) extraídos de <i>Acanthospermum australe</i>	73
4.12 Isolamento do componente majoritário do óleo de <i>T. minuta</i> CN	74
4.13 Dados dos compostos isolados	74
4.14 Determinação da atividade antimicrobiana “in vitro”	75
4.14.1 Meios de cultura empregados.....	76
4.14.2 Preparo das suspensões microbianas (inóculo).....	77
4.14.3 Determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) pelo método de microdiluição	77
4.15 Determinação da atividade antioxidante	77
4.15.1 Método do Radical Livre – Ensaio Qualitativo.....	78
4.15.2 Método do Radical Livre – Ensaio Quantitativo.....	78
5 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	81
5.1. Estudo dos óleos essenciais de <i>Calea clematidea</i>	81

5.1.1	Rendimento e propriedades físicas dos óleos voláteis de <i>Calea clematidea</i>	81
5.1.2	Análise dos óleos essenciais de caules de <i>C. clematidea</i>	82
5.1.2.1	Cromatogramas dos óleos essenciais de cascas de raízes de <i>C. clematidea</i>	83
5.1.2.2	Cromatogramas dos óleos essenciais de cascas de raízes de <i>C. clematidea</i>	84
5.1.2.3	Elucidação do terpeno 5 do óleo dos caules e raízes de <i>C. clematidea</i>	84
5.1.4	Determinação das atividades biológicas <i>in vitro</i> dos óleos essenciais de <i>Calea clematidea</i>	88
5.1.4.1	Teste de Atividade Antioxidante pelo Método do radical livre DPPH	88
5.1.4.2	Atividade antimicrobiana	89
5.2	Estudo dos óleos essenciais de <i>Acanthospermum australe</i>	92
5.2.1	Propriedades físicas e rendimentos dos óleos voláteis de <i>Acanthospermum australe</i>	92
5.2.2	Determinação dos constituintes do óleo das partes aéreas e raízes de <i>A. australe</i>	93
5.2.2.1	Análise do isolamento do componente majoritário dos óleos das raízes de <i>A. australe</i>	101
5.2.2.1.1	Determinação estrutural de AA1	102
5.2.2.1.2	Hidrólise alcalina da mistura AA1	112
5.2.3	Determinação das atividades biológicas <i>in vitro</i> dos óleos essenciais de <i>A. australe</i>	113
5.2.3.1	Teste de Atividade Antioxidante pelo Método do radical livre DPPH	113
5.2.3.2	Atividade antimicrobiana	114
5.3	Estudo dos óleos essenciais de <i>T. minuta</i>	118
5.3.1	Propriedades físicas e rendimentos dos óleos voláteis de <i>Tagetes minuta</i>	118
5.3.2	Determinação dos constituintes do óleo das partes aéreas de <i>T. minuta</i>	119
5.3.2.1	Identificação do componente majoritário do óleo de <i>T. minuta</i> CN	122
5.3.2	Determinação das atividades biológicas <i>in vitro</i> dos óleos essenciais de <i>T. minuta</i>	125
5.3.3.1	Teste de Atividade Antioxidante pelo Método do radical livre DPPH	125
5.3.3.2	Atividade antimicrobiana	125

5.4 Estudo dos óleos voláteis das amostras de <i>Julocroton humilis</i>	128
5.4.1 Propriedades físicas e rendimentos dos óleos voláteis de <i>Julocroton humilis</i>	128
5.4.2 Determinação dos constituintes do óleo das partes aéreas de <i>J. humilis</i> ...	128
5.4.2.1 Degradação observada no óleo volátil de <i>J humilis</i>	129
5.4.3 Determinação das atividades biológicas <i>in vitro</i> dos óleos essenciais de <i>J. humilis</i>	133
5.4.3.1 Teste de Atividade Antioxidante pelo Método do radical livre DPPH	133
5.4.3.2 Atividade antimicrobiana	133
5.5 Estudo do óleo essencial volátil de <i>N. megapotamica</i>	136
5.5.1 Degradação observada no óleo volátil de <i>N. megapotamica</i>	136
5.5.2 Propriedades físicas e rendimentos dos óleos voláteis de <i>N. megapotamica</i>	136
5.5.4 Determinação dos constituintes do óleo dos galhos e folhas de <i>N. megapotamica</i> nos diferentes períodos do ano	138
5.5.5 Análise do Isolamento dos componentes majoritários do óleo das folhas de <i>N. megapotamica</i>	143
5.5.5.1 Separação dos dois compostos majoritários do óleo das folhas de <i>Nectandra megapotamica</i> contidos em NmFr3	146
5.5.5.1.1 Determinação estrutural do majoritário PF1	148
5.5.5.1.2 Determinação estrutural do composto PF2	164
5.5.6 Análise do extrato hexânico das folhas de <i>Nectandra megapotamica</i>	175
5.5.7 Proposta biossintética para os sesquiterpenos PF1 e PF2.....	177
5.5.8 Determinação das atividades biológicas <i>in vitro</i> dos óleos essenciais de <i>N. megapotamica</i>	178
5.5.8.1 Teste de Atividade Antioxidante pelo Método do radical livre DPPH	178
5.5.8.2 Atividade antimicrobiana	178
5.6 Estudo dos óleos essenciais voláteis de <i>N. lanceolata</i>.....	182
5.6.1 Propriedades físicas e rendimentos dos óleos voláteis de <i>N. lanceolata</i>	182
5.6.2 Determinação dos constituintes do óleo dos galhos e folhas de <i>N. lanceolata</i>	182
5.6.3 Determinação das atividades biológicas <i>in vitro</i> dos óleos essenciais de <i>N. lanceolata</i>	185

5.6.3.1 Teste de Atividade Antioxidante pelo Método do radical livre DPPH	185
5.6.3.2 Atividade antimicrobiana	185
6 CONCLUSÕES	187
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	189

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade, desde tempos imemoriais, como importantes ferramentas nos procedimentos das terapias naturais, objetivando a busca por alívio e cura de doenças (MUKHERJEE; VENKATESH; GANTAIT, 2010).

O interesse popular no uso de plantas medicinais para fins terapêuticos tem sido muito significativo nos últimos tempos, principalmente nos países em desenvolvimento, devido ao difícil acesso da população aos medicamentos sintéticos. De acordo com a Organização mundial de Saúde (OMS), entre 60-80% da população mundial utiliza a medicina tradicional ou a fitoterapia no tratamento de várias doenças (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007).

A utilização de plantas como medicamento está fundamentada em estudos etnofarmacológicos que, partindo do uso tradicional e do conhecimento popular sobre as propriedades farmacológicas (antiinflamatória, analgésica, antimicrobiana, antiespasmódica, antitérmica, laxativas, entre outras) de certos compostos vegetais, indicam o potencial para o desenvolvimento de novos fitoterápicos (SCOPEL, 2005).

Neste contexto, as plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais, pode-se utilizar para a síntese de inúmeros fármacos (WALL; WANI, 1996). Segundo a OMS, dos 252 fármacos considerados básicos e essenciais, 11% são exclusivamente de origem vegetal (GURIB-FAKIM, 2006). Apesar de toda importância atribuída às plantas, o seu potencial é ainda pouco explorado. Segundo estimativas, o número de espécies vegetais superiores pode chegar a 500.000, sendo que destas, apenas 15 a 17% foram investigadas quanto ao seu potencial medicinal (BARROS, 2008).

Entre o conjunto de produtos naturais utilizados no desenvolvimento de medicamentos, pode-se destacar os óleos essenciais (OE), derivados do metabolismo secundário das plantas, que têm sua origem como uma resposta química às continuadas interações do material vegetal com animais e outras plantas (ARAÚJO, 2005) e com o objetivo de defender-se, comunicar-se e trocar informações (BERTUCCI et al., 2008).

Neste contexto o cultivo de espécies aromáticas tem aumentado e a obtenção de OEs constitui importante atividade econômica e os mesmos são amplamente utilizados como fragrância em cosméticos, aromatizantes de alimentos, bebidas e produtos de utilidade doméstica, como, por exemplo, detergentes, sabões, repelentes de insetos e aromatizantes de ambiente, além de seu emprego como intermediários sintéticos de perfumes (WOOLF, 1999). O uso de OE na aromaterapia tem se expandido por todo o mundo e inclui terapia contra várias doenças inflamatórias, alergias, reumatismo e artrite (MARUYAMA, 2005).

Além disso, plantas que possuem este tipo de produto natural são utilizadas *in natura* para a preparação de infusões com finalidades terapêuticas ou ainda para aromatização de formas farmacêuticas destinadas a uso oral, além da aromaterapia (LAVABRE, 1997; SIMÕES; SPITZER, 2000).

Nesse contexto, o grupo do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN) da UFSM, coordenado pelo professor Dr. Ademir Farias Morel, vem contribuindo não somente para a fitoquímica clássica, ou seja, para o isolamento e a determinação estrutural dos compostos químicos, mas também realizando trabalhos que envolvam atividades biológicas de plantas que apresentam algum tipo de uso na medicina popular. O grupo realiza principalmente uma triagem de espécies nativas do Rio Grande do Sul, buscando o isolamento e a determinação estrutural de compostos das plantas que tenham efeitos medicinais relatados pela cultura popular.

Dentre as espécies escolhidas para este trabalho selecionou-se uma espécie que já havia sendo trabalhadas pelo NPPN, *Calea clematidea*, assim como cinco plantas que pela primeira vez foram estudadas pelo mesmo núcleo: *Acanthospermum australe*, *Tagetes minuta*, *Julocroton humilis*, *Nectandra megapotamica* e *Nectandra lanceolata*.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O presente trabalho foi desenvolvido tendo como objetivo principal a investigação química, antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais de seis espécies pertencentes às seguintes famílias: Asteraceae, Euphorbiaceae e Lauraceae. Os espécimes selecionados dentro das famílias citadas são os seguintes:

Asteraceae

- *Calea clematidea*
- *Acanthospermum australe*
- *Tagetes minuta*

Euphorbiaceae

- *Julocroton humilis*

Lauraceae

- *Nectandra megapotamica*
- *Nectandra lanceolata*

2.2 Específicos

O estudo destas espécies teve como objetivos específicos:

- Isolar os constituintes voláteis (óleos essenciais) das partes aéreas e raízes das espécies selecionadas a partir de métodos de extração adequados como hidrodestilação.

- Identificar estruturalmente os compostos isolados através de métodos comparativos e da aplicação de métodos físicos, tais como espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear.
- Quantificar os compostos majoritários presentes nas frações voláteis de todas as espécies estudadas
- Comparar a constituição química do óleo essencial extraído das espécies selecionadas quanto à sazonalidade
- Realizar ensaios biológicos para a determinação das atividades antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais e terpenos isolados dos referidos óleos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Sistemática Vegetal

3.1.1 Família Asteraceae

A família Asteraceae é cosmopolita, contando com aproximadamente 1.100 gêneros e aproximadamente 25.000 espécies, encontradas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas montanhosas, sendo mais abundantes nas regiões abertas e áridas do que nas florestas tropicais úmidas (BARROSO, 1991; JUDD et al., 1999). No Brasil, está representada por cerca de 180 gêneros, que em sua grande maioria são constituídos de plantas herbáceas, anuais ou perenes, subarbustivas ou arbustivas e raramente arbóreas (BARROSO, 1991).

3.1.1.1 O gênero *Calea*

O gênero *Calea* é formado por aproximadamente 110 espécies encontradas em regiões tropicais e subtropicais, cuja presença de germacranolídeos aparece como característica comum (PRUSKI; URBATSCH, 1988; YAMADA, 2004). Muitas atividades biológicas foram descritas para esse gênero. A espécie *Calea zacatechichi* apresenta atividade antiinflamatória, *Calea glomerata* vasodilatadora, *Calea platylepis* antimicrobiana, *Calea uniflora* antiparasitária e antifúngica e *Calea urticifolia* citotóxica in vitro com indução da apoptose (VENEGAS; SEGURA; VÁZQUEZ, 2002; NASCIMENTO, 2004a/b; YAMADA, 2004; NAKAGAWA, 2005).

3.1.1.1.1 *Calea clematidea*

Calea clematidea é um arbusto nativo das regiões sul do Brasil e do Uruguai (**Figura 1**). No Rio Grande do Sul é tradicional o seu uso pelas pessoas locais como antigripal, estomático e contra úlceras gástricas. Flach et al (2002) determinaram a composição do óleo volátil de folhas e flores e nesta oportunidade, um novo epóxido natural denominado caleol (**Figura 2**) foi isolado e sua estrutura determinada. Além disso, as atividades antifúngicas do óleo e do composto isolado foram determinadas.



Figura 1. *Calea clematidea*

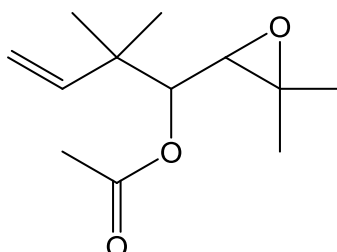


Figura 2. Estrutura do caleol

3.1.1.2 O gênero *Acanthospermum*

O gênero *Acanthospermum* compreende quatro espécies: *A. australe*, *A. hispidum*, *A. humile* e *A. xanthioides*. A espécie *Acanthospermum hispidum* tem sido muito utilizada em pesquisas de atividades biológicas, baseadas na utilização popular dessa espécie no Brasil e em várias partes do mundo (MORAIS, 2005; TÔRRES, 2005). Em 2003, foram pesquisadas as atividades antimicrobiana (FLEISCHER; AMEADE; SAWER, 2003) e antiplasmodial (SANON, 2003) do extrato de *Acanthospermum hispidum*, obtendo-se diferentes níveis de atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram positivas, além de relevante atividade sobre o agente etiológico da malária (CARVALHO; KRETTLI, 1991; CARVALHO, 1991).

3.1.2.2.1 *Acanthospermum australe*

A espécie *Acanthospermum australe* é um vegetal herbáceo, nativa da América tropical e amplamente dispersa no Brasil, onde cresce com grande vigor em solos agrícolas de campos e em cerrados de textura arenosa, pastagens e terrenos baldios (LORENZI; MATOS, 2002). É popularmente conhecida como carrapichinho, carrapicho-rasteiro, mata-pasto, marôto, amor-de-negro, carrapicho-de-carneiro, picão-da-prata, cordão-de-sapo, carrapicho-miúdo, chifrinho, pega-pega (LORENZI, 2000a/b; LORENZI; MATOS, 2002) (**Figura 3**).

Esta espécie é uma planta herbácea, anual e prostrada, de caules pubescentes e arroxeados, medindo de 20 a 40 cm de comprimento (LORENZI, 2000a/b). Trata-se de uma planta muito variável, cujas folhas podem ser simples, inteiras ou de margens irregularmente serradas, medindo de 1,5 a 3,5 cm de comprimento. Possui capítulos terminais, com poucas flores de cor amarela e seus frutos são providos de projeções rígidas. Reproduz-se por sementes (LORENZI, 2000a; LORENZI; MATOS, 2002).

Os ramos de *Acanthospermum australe* são amplamente empregados na medicina tradicional brasileira na forma de chás por infusão ou decocção, utilizada como tônica, diaforética, eupéptica (digestiva), vermífuga, antidiarreica, antimalárica, aromática, antiblenorrágica, febrífuga, e antianêmica. Ainda pode ser utilizada

externamente na forma de banho contra dores lombares, renais, ou nos membros, úlceras, feridas e micoses (LORENZI; MATOS, 2002).

Em 1987, Shimizu et al. (1987) relataram o uso de *A. australe* no tratamento de estagnações sangüíneas, reumatismos e artrites por via oral, além do uso externo em inchaços e hemorragias. Nesse trabalho, o extrato etanólico bruto de *A. australe* foi analisado quanto à atividade inibitória sobre a enzima aldose redutase em ratos.

Foi constatado por Carvalho et al. (1991) e por Krettli et al. (2001), que o extrato bruto de *Acanthospermum australe* foi parcialmente ativo contra *Plasmodium falciparum* em ratos infectados. Em 1997, Macedo et al. pesquisaram a atividade larvicida do extrato de *Acanthospermum australe*, sobre larvas de *Aedes fluviatilis*. Mendes et al. (1999) pesquisaram a atividade moluscicida do extrato etanólico de *A. australe*. Portillo et al. (2001) investigaram a atividade anti-fúngica sobre fungos leveduriformes e dermatófitos do extrato de *A. australe*.

Bohlmann et al. (1981) constataram a presença de muitas lactonas sesquiterpênicas e diterpênicas, obtidas a partir das partes aéreas de *A. australe*. Do extrato etanólico bruto das partes aéreas desta espécie foram isolados os flavonóides: trifolina, hiperina, rutina, penduletina, axilarina, crisosfenol D e 5,7,4'-trihidroxi-3,6-dimetoxiflavona, quercetina, bem como o ácido cafeico (DEBENEDETTI, 1987; SHIMIZU, 1987) e 6-metoxi flavonóides (DEBENEDETTI, 1987). Em 1996, Matsunaga et al. (1996) isolaram um germacranolídeo, denominado acantostral, que apresentou atividade inibitória sobre tumores cancerosos.

Outro estudo químico das partes aéreas (caule, folhas, flores e frutos) de *A. australe*, coletado em Campo Grande, Mato Grosso do Sul permitiu a identificação da lactona diterpênica conhecida como acetato de acantoaustralida além dos flavonóides: quercetina e crisosfenol D (MARTINS et al., 2006).



Figura 3. *Acanthospermum australe*

Em relação a estudos de composição química dos óleos voláteis desta espécie foi encontrado na literatura estudos de Morais et al (1997), onde o óleo das folhas de *A. australe* foi analisado por CG/EM e espectrometria ^{13}C -RMN. Os componentes encontrados no óleo foram: β -cariofileno (16.0%), β -elemeno (14.4%), γ -cadineno (13.0%), germacreno A (10.1%) e δ -cadineno (5.5%).

Em outro estudo realizado na cidade de Lajeado-RS as raízes de *Acanthospermum australe* foram submetidas a hidrodestilação onde verificou-se a presença de sete constituintes, sendo que o constituinte majoritário não pôde ser identificado por CG-EM e índice de Kovats (BECKER, 2008). Neste mesmo experimento, o óleo de *A. australe* foi testado em duas concentrações, com cinco repetições para cada tratamento, utilizando-se o delineamento experimental inteiramente casualizado. Além da testemunha, ou branco, onde foi aplicado somente etanol, utilizou-se um controle negativo com o acaricida Vertimec® na concentração 0,1%, conforme dose recomendada pelo fabricante. Na concentração 2,0%, o OE da espécie em questão obteve resultados semelhantes ao acaricida

comercial utilizado como controle negativo, apresentando atividade 12 horas após a aplicação (BECKER, 2008).

3.1.1.3 O gênero *Tagetes*

Tagetes engloba algumas espécies da família das Asteraceae, todas originárias do México e introduzidas no Brasil há muitos anos, onde se aclimataram perfeitamente. São descritas 26 espécies com uma variedade de propriedades biológicas, incluindo atividades contra bactérias, vírus, fungos, nemátodos, ácaros e insetos (CUBILLO; SANABRIA, 1999; SERRATO; QUIJANO, 2003).

3.1.1.3.1 *Tagetes minuta*

A espécie *Tagetes minuta* faz referência ao tamanho das flores e não da planta, que pode alcançar até 2 metros de altura (**Figura 4**). A planta é popularmente denominada chinchilia, vara-de-rojão, rabo-de-foguete, cravo-de-defunto, cravo-de-urubu, chinchilho, coari, coari-bravo, estrondo. *T. minuta* é uma planta reproduzida por semente, com germinação na primavera e verão, na Região Sul do Brasil; apresenta ciclo de 120-150 dias até a formação de sementes. Ocorre em terrenos secos e desenvolve-se melhor naqueles cultivados, de boa fertilidade e em áreas onde se efetuaram (SOUZA; AVANCINI; WIEST, 2000).



Figura 4. *Tagetes minuta*

Na literatura pesquisada, os autores descrevem os componentes existentes no óleo essencial da *T. minuta* com composições e proporções variáveis.

Quer (1985) relata a existência de 30 % de ocimeno e 3 % de limoneno dextrógiro no óleo essencial. Singh apud Souza (2000), baseados em vários estudos realizados em diferentes partes do mundo, efetuou uma análise do óleo essencial das flores de *T. minuta* do noroeste do Himalaia, identificando entre os 20 componentes os seguintes como os principais: (2)- β -ocimeno (39,44%), dihidrotagetona (15,43%), (2)-tagetona (8,78%), (E)-ocimenona (14,83%) e (Z)-ocimenona (9,15%).

Após a extração com CO₂ do óleo da *T. minuta* foram identificados componentes já descritos acima como: limoneno (15%), cis-ocimeno (19,3%), diidrotagetona (5,2%), cis-ocimenona (13,3%) e trans-anetol (9,9%) o qual foi detectado no óleo hidrodestilado também (DAGHERO et al., 1999).

Outro grupo de pesquisadores que realizaram a extração do óleo essencial da flor da espécie em questão foi Kaul et al (2005), que encontraram limoneno + β – felandreno (4,7%), (Z)– β –ocimeno (36,8%), diidrotagetona + (E)- β -ocimeno (15,5%), (Z)–tagetona (17,1%), (Z)-tagetenona (3%) e (E)-tagetenona (7,5%).

Segundo Rodriguez; Mabry (1977), a *T. minuta* seria rica em componentes secundários como monoterpenos acíclicos e bicíclicos, sesquiterpenos, flavonóides e tiofenos. Hethelyi et al (1986), determinaram a atividade de 5 componentes secundários da *Tagetes minuta*: β -ocimeno, diidrotagetona, tagetona, (Z)–ocimeno e (E)-ocimeno. Os testes sobre 40 cepas de bactérias e fungos demonstraram que óleo essencial de *Tagetes minuta* teve 100% de efeito inibitório sobre as bactérias Gram positivas e 95 % de efeito inibitório sobre as bactérias Gram negativas além de 100% de efeito inibitório sobre fungos.

Hudson (1990) testou os variados componentes secundários para atividade antiviral e determinou que os tiofenos demonstraram grande atividade antiviral em pequenas doses. Moléculas com dois ou mais unidades de tiofenos mostraram a atividade mais alta. Em todos os casos o sucesso foi maior contra vírus envelopados. Hudson testou 32 tiofenos, avaliando a sua eficácia e determinou os 10 mais efetivos.

Atkinson et al (1964) foram os primeiros a encontrar tiofenos na *Tagetes minuta*. Comparando os resultados de Atkinson com os de Hudson observou-se que 7 dos 10 mais efetivos tiofenos contra vírus são encontrados na *Tagetes minuta*.

Outros autores relatam que seu óleo essencial possui propriedades inseticidas, antifúngicas e antissépticas (QUER, 1985). Há evidências que alguns de seus componentes químicos atuam contra organismos como fungos (CHAN; TOWERS; MITCHEL, 1975), fungos patogênicos (CAMM; TOWERS; MITCHELL, 1975), bactérias (GROVER; RAO, 1978), vermes redondos em geral (LOEWE, 1974), nematódeos (GRAINGE; AHMED, 1988) e numerosos insetos através de vários mecanismos diferentes (JACOBSON, 1990; SAXENA; KOUL, 1982; MARADUFU; LUBEGA; DOM, 1978; SAXENA; SRIVASTAVA, 1973).

Segundo Moreira (1996), as flores deste espécime são muito empregadas quando cozidas ou em infusão contra as dores reumáticas, os resfriados e a tosse; as raízes e as sementes apresentam efeitos laxativos. Chandhoke e Ghatak (1969), trabalharam em animais de laboratório e determinaram que o óleo possui

propriedades de hipotensão, broncodilatação, espasmolítica, ant-inflamatória e tranqüilizantes.

Alguns estudos têm citado a atividade antimicrobiana do extrato de *Tagetes minuta*. Souza et al (2000) sugerem a possibilidade de sua utilização após decocto, como antiséptico e desinfetante. Este estudo demonstrou que *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Salmonella* possuem sensibilidade ao decocto, evidenciando ação seletiva. Barbosa et al (1994) revelaram pequena atividade antimicrobiana do extrato fluido de plantas medicinais brasileiras (*in vitro*), dentre elas a *Tagetes minuta*, não sendo notada nenhuma atividade contra bacilos Gram negativos utilizados no experimento.

Tereschuk et al (1997) testaram a atividade dos flavonóides das folhas de *Tagetes minuta* como antimicrobianos. Segundo eles, o principal componente do extrato: quercetagetina-7 arabinosil-galactosídeo, mostrou significativa atividade antimicrobiana sobre os microorganismos patogênicos testados. O extrato total e frações com diferentes solventes, obtidos das folhas de *T. minuta* mostraram diversos graus de atividade antimicrobiana contra microorganismos Gram positivos e Gram negativos. As mesmas frações foram inativas contra espécies de *Lactobacillus*, *Zymomonas* e *Saccharomices*.

3.1.2. Família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae possui aproximadamente 7500 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropicais, onde os maiores centros de dispersão ficam na América e na África (CORRÊA, 1984 apud BRANCO; PIZZOLATTI, 2002). Essa família consiste de plantas dicotiledôneas, ervas, arbustos e árvores, algumas suculentas semelhantes a cactos, que são caracterizadas frequentemente pela ocorrência de seiva leitosa geralmente tóxica.

3.1.2.1 Gênero *Croton*

O gênero *Croton*, um dos maiores gêneros da família Euphorbiaceae, compreende plantas de hábitos heterogêneos que vão desde árvores, arbustos, subarbustos, ervas e trepadeiras (RADULOVIC et al., 2006). Com cerca de 300 espécies, o Brasil é um dos principais centros de diversidade do gênero, que está representado nos mais variados ambientes e tipos vegetacionais (BERRY, 2005a).

A maioria das espécies deste gênero são produtoras de óleos essenciais cuja composição química é rica em mono- e sesquiterpenos, além de fenilpropanóides (PALMEIRA-JUNIOR et al., 2006). Esses componentes voláteis, que são os responsáveis pelo agradável aroma dessas plantas, apresentam uma enorme diversidade estrutural, o que aumenta as chances desses óleos essenciais se tornarem verdadeiras fontes de substâncias bioativas (RANDAU et al., 2004).

3.1.2.1.1 *Julocroton humilis*

O gênero *Julocroton* reconhecido em trabalhos clássicos sobre a família Euphorbiaceae, como o Prodrômus de De Candolle (MÜLLER, 1866) e a Flora brasiliensis (MÜLLER, 1873), foi sinonimizado por Webster (1992) e tratado como uma seção de *Croton*. Os estudos de Berry et al. (2005a, b) e Wurdack et al. (2005) justificaram filogeneticamente a sinonimização de *Julocroton* em *Croton* e também demonstraram a necessidade de exclusão de *Croton* sect. *Astraea* (Klotzsch) Baill., de maneira a tornar o gênero *Croton* monofilético.

Julocroton humilis ou *Croton humilis*, popularmente conhecida como “velame do campo”, tem como características mais marcantes, a cor de suas folhas e o seu aroma (**Figura 5**). Suas folhas são geralmente verdes na parte adaxial, e cinza ou branca na parte abaxial. O caule é liso, com o manto de uma setose-rígida com amarelo e folhas pecioladas (MÜLLER, 1873).



Figura 5. *Julocroton humilis*

Existem poucos relatos referentes à espécie em questão, um dos estudos traz o isolamento do alcalóide julocrotina (**Figura 6**) de *Croton humilis* ainda na década de 60 (STUART, 1971), este composto apresenta atividade anti-leishmaniose (MOREIRA et al., 2008). Esta planta também é referida como sendo empregada no tratamento de distúrbios urinários (GUIMARÃES, 2006). Até o momento nenhum estudo relatando extração de óleos essenciais desta espécie foi encontrado.

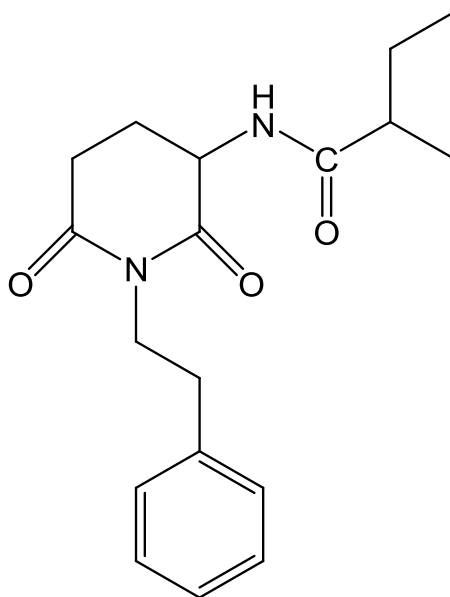


Figura 6. Julocrotina, alcaloide isolado de *Julocroton humilis*

3.1.3. Família Lauraceae

A família Lauraceae é formada por cerca de 50 gêneros e 2.500 espécies, sendo que no Brasil ocorrem 25 gêneros e cerca de 400 espécies. É uma família com distribuição tropical e subtropical concentrada em florestas pluviais da Ásia e das Américas (SOUZA; LORENZI, 2005).

Os gêneros *Aniba*, *Nectandra* e *Ocotea* são aqueles que apresentam o maior número de espécies de importância econômica (MARQUES, 2001) Os óleos essenciais da família Lauraceae podem ser encontrados tanto nas folhas como na própria madeira, destacando-se o óleo do pau-rosa, sassafrás, canela-da-China, entre outros (CRAVEIRO et al., 1981).

3.1.3.1 Gênero *Nectandra*

Nectandra Rol. ex Rottb está entre os mais importantes gêneros da família, em número de espécies. É um gênero restrito às Américas Tropical e Subtropical, representada por 114 espécies reconhecidas até o presente e destas, 43 são brasileiras. O gênero é composto por árvores monóicas de folhas penínérveas a alternas, raras opostas e subopostas (BAITELLO et al., 2003).

Este gênero é caracterizado pela presença de alcalóides do grupo benzoquianolínicos (BOHLKE et al., 1996) aporfínicos e indólicos (SANTOS; GILBERT, 1975), lignanas (SILVA FILHO, 2004) e neolignanas (BRAZ; FIGLIUOLO; GOTTLIEB, 1980).

Os óleos essenciais deste gênero são pouco estudados. Na literatura são reportados os estudos dos óleos voláteis de *N. rigida* (Kunth) Nees cujos componentes majoritários são α -felandreno e β -felandreno (MORAIS, 1971), *N. augustifolia* Nees possui p-menta-1(7), 8-dieno e α -terpinoleno (TORRES, 2005), em *N. salicina* C. K. Allen α -pineno, viridifloreno β -cariofileno e o sesquiterpeno oxigenado atractilona foram os constituintes majoritários encontrados nas folhas e nos galhos atractilona e germacreno D (CHAVERRI; CICCIO, 2009), em *N. umbrosa* (Kunth) Mez foi encontrado cadinol, germacreno B e espatulenol no óleo essencial dos frutos (VALLEY; SCORA, 1999).

3.1.3.1 *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez

N. megapotamica é vulgarmente conhecida como canela-louro, canela-preta, canela-ferrugem e canela-fedorenta. Ocorre no Paraguai, Argentina, Uruguai e Brasil nas regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste. Floresce entre abril e outubro e frutifica de outubro a janeiro (**Figura 7**). Apresenta ampla dispersão pela floresta ombrófila em geral, sendo menos frequente nas associações pioneiras e secundárias, e muito rara em sub-bosques de pinhais e capões. A madeira é moderadamente pesada, fácil de trabalhar, porém com cheiro desagradável quando fresca. Apresenta a superfície irregularmente lenhosa, de média durabilidade sob condições naturais. É utilizada na medicina popular como analgésico, calmante e no tratamento de doenças reumáticas (BAITELLO et al., 2003).

Os estudos fitoquímicos desta espécie revelam a presença de sesquiterpenos e fenilpropanóides no extrato do tronco (GARCEZ, 2007), alcalóides (SANTOS; GILBERT, 1975) e lignanas tetrahidrofurânicas (SILVA FILHO, 2004) com atividade tripanocida e leishmanicida (SILVA FILHO, 2008), analgésica e antiinflamatória (SILVA FILHO, 2004; APEL et al., 2006), os quais confirmam as propriedades indicadas pela medicina tradicional.

Das cascas do caule de *N. megapotamica* foram isolados: dois alcalóides indólicos inibidores do crescimento *in vitro* de *Crithidia fasciculata* e *Trypanosoma cruzi*. Além disso, foram isolados um fenilpropanóide que apresentou atividade analgésica e neolignanas tetraidrofurânicas com atividade antiinflamatória em ratos e camundongos. Das folhas foram obtidas onze neolignanas tetraidrofurânicas, três das quais com atividade tripanocida *in vitro* (GARCEZ, 2009).



Figura 7. *Nectandra megapotamica*

Em relação a estudos de composição química dos óleos voláteis desta espécie foram encontrados principalmente estudos realizados no estado de São Paulo. O estudo de Romoff et al (2010) apresentou um total de dezenove componentes identificados sendo o seu componente majoritário o α -bisabolol (62.3–69.4%). Em outro estudo com a sinonímia *N. saligna* Nees os resultados mostram que existe variação na composição química de indivíduos coletados em regiões

diferentes. O indivíduo coletado em Presidente Venceslau apresentou como constituintes majoritários δ -elemeno e seicheleno, enquanto o indivíduo de Presidente Prudente apresentou *trans*-cariofileno, biciclogermacreno e germacreno D como majoritários (MELO, 2003)

Nos relatos de Brito (2009) existe variação na composição do óleo essencial de folhas de indivíduos coletados na região do Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI)-SP. Foram coletados três indivíduos nesta mesma região, dois indivíduos apresentaram como constituinte majoritário α -santaleno (15,61 a 17,42%), enquanto a coleta do terceiro indivíduo apresentou o majoritário muurola-4,10(14)-dien-1- β -ol (23,09%) e este não possuía α -santaleno na sua composição.

Recentemente, estudos de Tondolo (2011) demonstraram que o óleo essencial das folhas de *N. megapotamica* coletadas em Santa Maria-RS é constituído por 21 substâncias, das quais biciclogermacreno e α -pineno foram os componentes majoritários.

Os óleos essenciais de *N. megapotamica* possuem atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, atividade antiinflamatória e antitumoral indicando que este óleo essencial possui potencial farmacológico (APEL, 2006).

3.1.3.2 *Nectandra lanceolata*

Nectandra lanceolata é uma árvore com 10 a 15 m de altura popularmente conhecida no Brasil como ajuba, louro-amarelo, louro-amargoso, louro-besuntão, louro-dobrejo, louro-fedorento, louro-goiaba, louro-preto e pau-de-santana (**Figura 8**). Possui flores branco-amareladas e frutos com baga elipsóide e escura quando madura (CARVALHO, 2002).

O único trabalho encontrado acerca da parte fitoquímica desta planta relata que as folhas de *N. pichurim* (sinonímia de *N. lanceolata*) possuem cerca de 0,2% do alcalóide Glaziovina (**Figura 9**) (BATISTA; GARCEZ; GARCEZ, 2000), pertencente à família proaporfina. No início dos anos 1970 a farmacologia deste alcaloide foi explorada extensivamente por uma empresa farmacêutica (Simes SpA, Milano) sendo registrado como um calmante sob a marca Suavedol® (BUFFA; COSTA; GHIRARDI, 1974).



Figura 8. *Nectandra lanceolata*

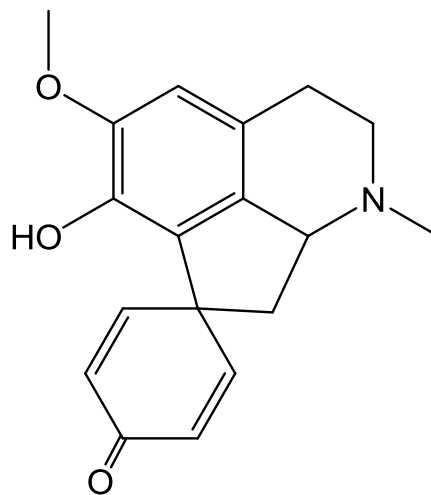


Figura 9. Estrutura da glaziovina

3.2 Óleos essenciais

O uso dos óleos essenciais como agentes medicinais é conhecido desde a remota antiguidade. Há registros pictóricos de seis mil anos atrás, entre os egípcios, de práticas religiosas associadas à cura de males, às unções da realeza, e à busca de bem estar físico, através dos aromas obtidos de partes específicas de certos vegetais, como resinas, folhas, flores, sementes, etc (TYRREL, 1990).

As substâncias aromáticas também já eram populares nas antigas China e Índia, centenas de anos antes da era cristã, quando eram incorporados em incenso, poções e vários tipos de acessórios, usados diretamente sobre o corpo. No entanto, foi apenas a partir da Idade Média, através do processo de destilação, introduzido pelos cientistas muçulmanos, que se iniciou a real comercialização de materiais aromáticos (TYRREL, 1990).

Conforme a International Standard Organization (ISO), descrito por SIMÕES (2003), os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. A designação de “óleo” é devida a algumas características físico-químicas como a de serem geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente.

São conhecidos aproximadamente 3000 óleos essenciais, e destes, 300 são comercialmente importantes, especialmente nas indústrias farmacêuticas, agrônômicas, alimentícias, cosméticas e de perfumes (BAKKALI, 2008). Além disso, estudos estabeleceram que aproximadamente 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e que 35% apresentam propriedades antibacterianas (BHAVANANI; BALLOW, 2000; LIMA, 2006).

Os compostos dos óleos voláteis incluem dois grupos com base na origem biossintética: os derivados dos terpenóides formados pela via do mevalonato ou pela via do DPX (1-deoxi-D-xilose-5-fosfato) e derivados do fenilpropanóide, compostos aromáticos formados pela via do ácido chiquímico. Os compostos terpênicos, derivados dos terpenóides, constituem a maioria dos óleos essenciais (BAKKALI, 2008).

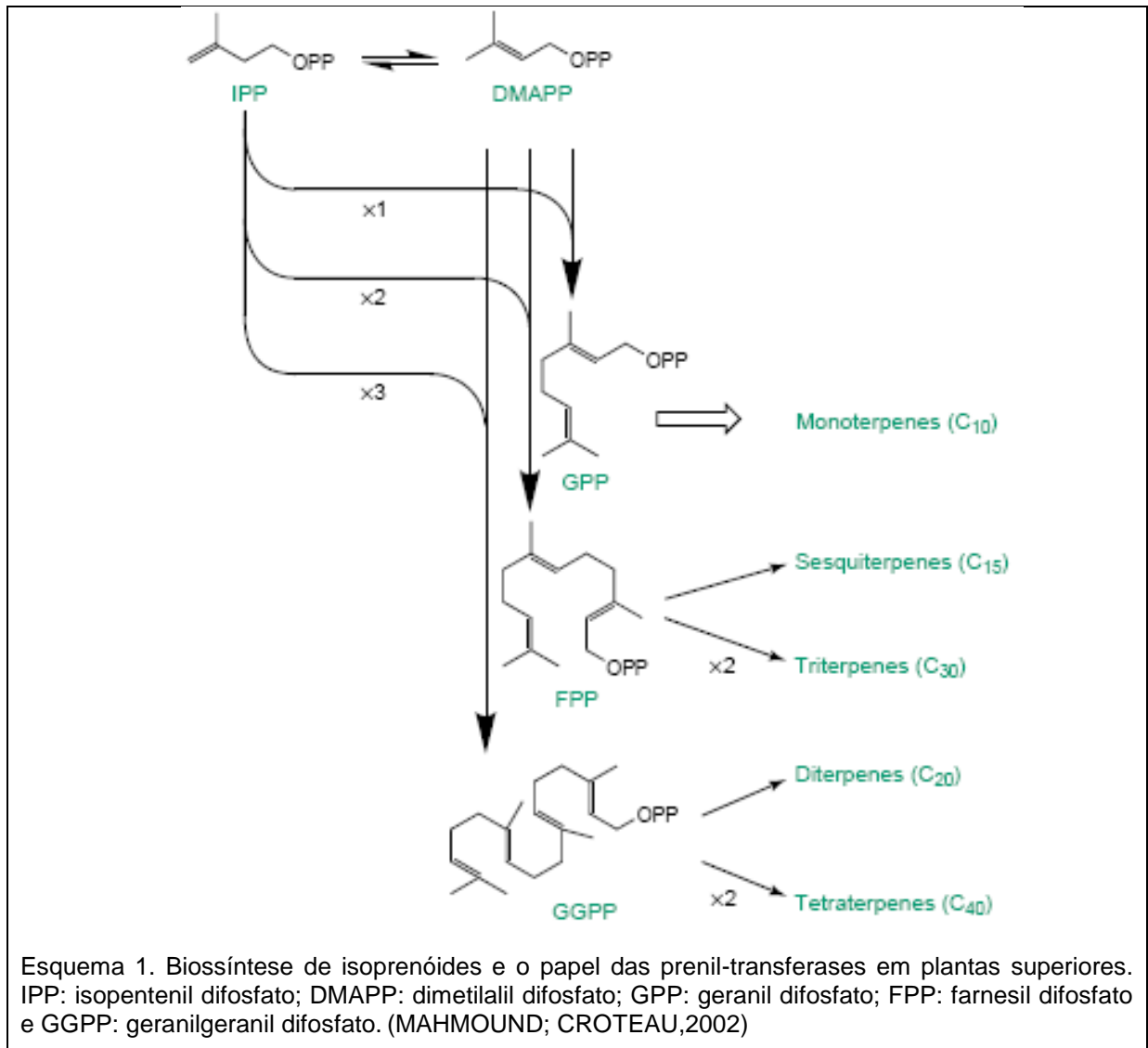
Os terpenóides ou isoprenóides são uma larga e diversa família de produtos naturais possuindo diversas estruturas moleculares desde lineares a policíclicas,

como hemiterpenos de cinco carbonos à borracha natural, com mais de 1000 unidades isoprênicas (DUDAVERA et al., 2004; MAHMOUND; CROTEAU, 2002).

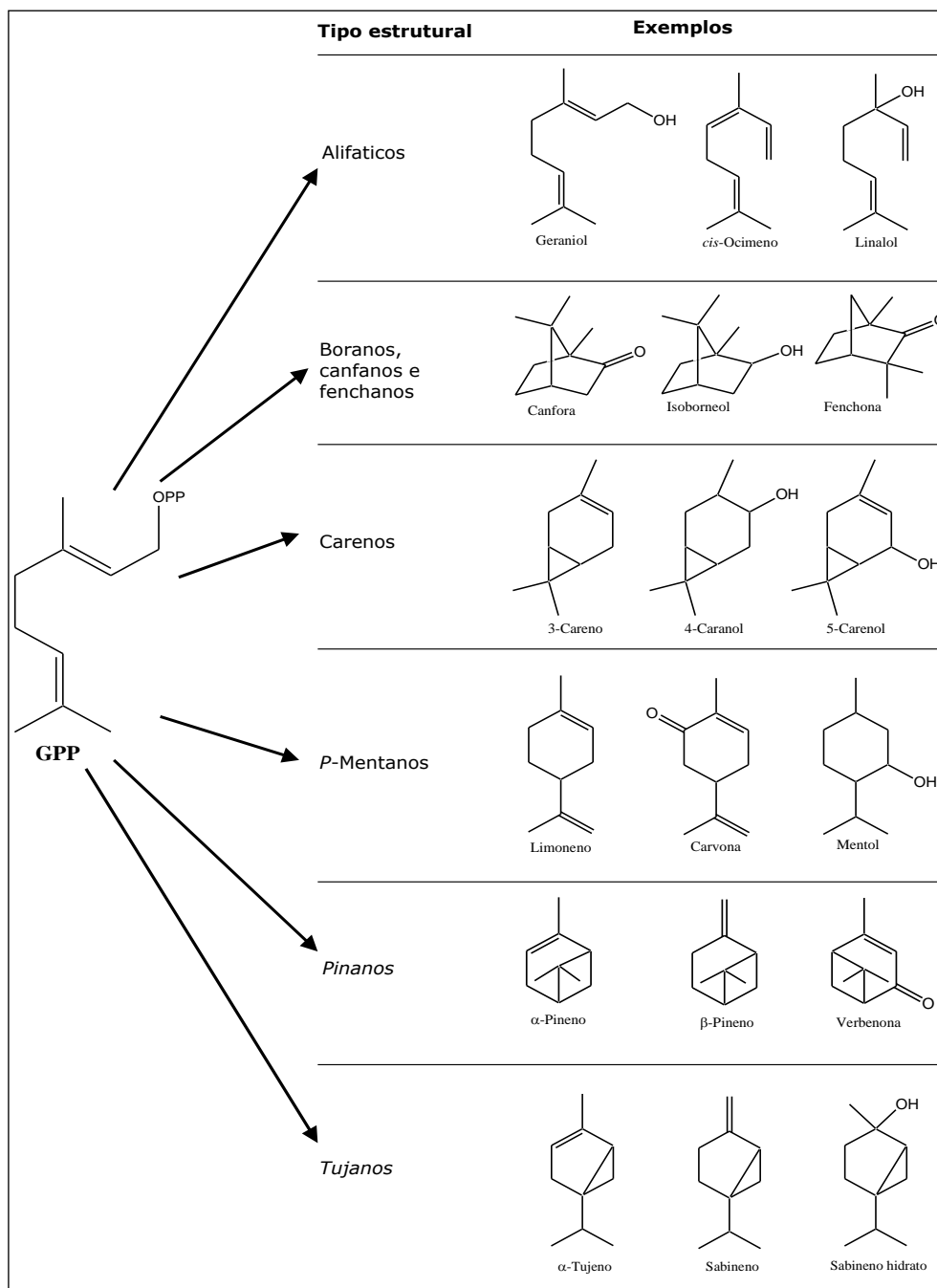
Os terpenóides são sintetizados por condensações de unidades do isopreno Isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP) e são classificados pelo número de unidades isoprênicas que possuem em sua estrutura. Os principais terpenóides encontrados nos óleos essenciais podem ser divididos em mono, di e sesquiterpenos (**Esquema 1**) (MAHMOUND; CROTEAU, 2002; ROHDICH et al., 2001).

Os terpenos regulares, a maioria, são formados pela adição sequencial tipo “cabeça-cauda” do DMAPP e do IPP e os irregulares, minoria, pela associação não “cabeça-cauda” de unidades construtoras ou pelo rearranjo de estruturas regulares (MAHMOUND; CROTEAU, 2002).

A adição sequencial “cabeça-cauda” de unidades de IPP e DMAPP inicialmente gera geranyl difosfato (GPP, C₁₀), farnesil difosfato (FPP, C₁₅) e geranylgeranyl difosfato (GGPP, C₂₀) os quais são precursores lineares da maioria das classes dos terpenóides (MAHMOUND; CROTEAU, 2002).



Os monoterpenos regulares são exclusivamente derivados do GPP, o qual é frequentemente ciclizado para produção do esqueleto principal de várias subfamílias de monoterpenos; relativamente poucos monoterpenos como linalol, geraniol e ocimeno são acíclicos. Os monoterpenos p-mentano característico nas mentas são ciclohexanóides, entretanto, todos os outros grupos maiores como borano, canfeno, fenchano, careno e tujeno tem esqueletos carbônicos bicíclicos. Muitos monoterpenos (**Esquema 2**) são produzidos por modificação de um composto inicial derivado do GPP.



Esquema 2. Membros representativos de várias subfamílias de monoterpenos

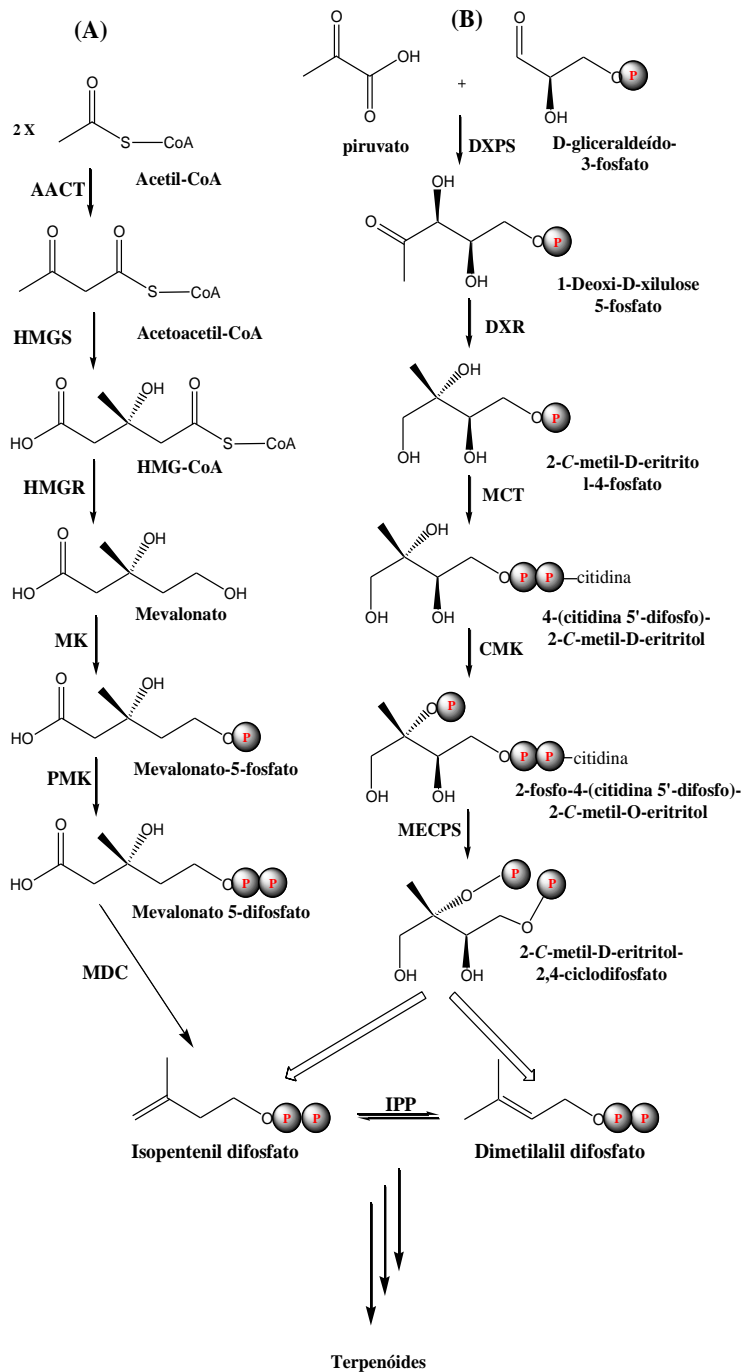
Os monoterpenos irregulares são obtidos pela união diferenciada de duas unidades do isopreno e rearranjos estruturais. Assim, embora DMAPP e IPP sejam utilizados na biossíntese, o geranyl PP e o farnesil PP não parecem estar envolvidos (DEWICK, 2000).

A biossíntese de monoterpenos pode ser dividida em quatro fases: (1) construção de unidades básicas C₅, IPP e DMAPP; (2) condensação do IPP e DMAPP via feniltransferases para formar GPP, C₁₀; (3) conversão do GPP as estruturas de várias subfamílias de monoterpenos, catalisado por terpeno sintases; e (4) transformação da estrutura básica em seus vários derivados. (DUDAVERA et al., 2004; MAHMOUD; CROTEAU, 2002; BERTOMEU, 2006).

Duas distintas rotas biossintéticas para formação de IPP e de DMAPP estão envolvidas (**Figura 10**): a clássica rota do mevalonato (MVA), a partir do Acetil Coa, no citosol, que fornece precursores para biossíntese de sesquiterpenos (C₁₅) e triterpenos (C₃₀) e a rota do metileritrol fosfato (MEP) também chamada rota do 1-deoxi-D-xilose-5-fosfato (DPX) (ROHDICH et al., 2001) localizada nos plastídeos, que fornece IPP para biossíntese de mono (C₁₀) diterpenos (C₂₀) e tetraterpenos (C₄₀) (DUDAVERA et al., 2004; ROHDICH et al., 2001; BERTOMEU, 2006; HUNTER, 2007).

A rota do MEP inicia pela condensação tipo transcetolase de dois carbonos do piruvato com gliceraldeído-3-fosfato formando 1-deoxi-D-xilose-5-fosfato (DPX), catalizada por DXP sintase (DXS) (HUNTER, 2007), seguido da isomerização e redução do DXP a 2-C-metil-D-eritrol-4-fosfato, formação do derivado citidil-difosfato, fosforilação do C₂ e ciclização do 2-C-metil-eritritol-2,4-ciclodifosfato, o qual leva ao 4-hidroxi-DMAPP e posteriormente ao IPP e DMAPP (RODRIGUEZ, 2000).

Ocorre a condensação do IPP e DMAPP para formação de GPP, FPP e GGPP precursores de mono, sesqui e diterpenos, respectivamente. As reações são catalisadas por preniltransferases. A formação de GPP é muito complexa (DUDAVERA et al, 2004). A última fase da biossíntese de terpenos voláteis envolve a conversão de vários prenildifosfatos, DMAPP (C₅), GPP (C₁₀), FPP (C₁₅) e GGPP (C₂₀) a hemiterpenos (isopreno e 2-metil-3-buten-2-ol), mono, sesqui e diterpenos, respectivamente. Essas reações são realizadas por enzimas sintases produzindo representantes de cada esqueleto carbônico (DUDAVERA et al, 2004).



AACT, acetil-CoA:acetil-CoA C-acetiltransferase;

CMK, 4-(citidina-5'-difosfo)-2-C-metileritritol quinase;

DXPS, 1-deoxixilulose-5-fosfato sintase;

DXR, 1-deoxixilulose-5-fosfato redutoisomerase;

HMGR, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase;

HMGS, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintase;

IPPI, isopentenil difosfato isomerase;

MCT, 2- C-metileritritol-4-fosfato citidiltransferase;

MDC, mevalonate-5-difosfato descarboxilase;

MECPS, 2- C-metileritritol-2,4-ciclodifosfato sintase;

Figura 10. Rota biossintética do mevalonato (a) rota independente do mevalonato (deoxixilose fosfato) (b) para a biossíntese do isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP). O fosfato livre é destacado em vermelho e as flechas mais largas indicam passos que ainda não foram identificados. (MAHMOUD; CROTEAU,2002)

3.2.1 Extração dos Óleos Essenciais

Segundo Simões et al. (1999), a extração dos óleos pode se dar através de técnicas como destilação por arraste a vapor, hidrodestilação, extração com CO₂ supercrítico, expressão a frio, entre outros. Os métodos de extração variam conforme a localização do óleo na planta (flores, folhas, cascas, raízes e rizomas) e sua utilização. Uma descrição sucinta dos processos é apresentada a seguir.

3.2.1.1 Enfleurage

Enfleurage é um método de extração empregado para extrair óleo essencial de pétalas de flores. As pétalas são depositadas, à temperatura ambiente, sobre uma camada de gordura, durante certo período de tempo. Em seguida essas pétalas esgotadas são substituídas por novas até a saturação total, quando a gordura é tratada com álcool. Para se obter o óleo essencial, o álcool é destilado à baixa temperatura e o produto resultante possui alto valor comercial (LIMA, 2006).

3.2.1.2 Arraste por vapor d'água

Os óleos voláteis possuem tensão de vapor mais elevada que a da água, sendo, por isso, arrastados pelo vapor d'água. Em pequena escala, emprega-se o aparelho de Clevenger. O óleo volátil obtido, após separar-se da água, deve ser seco com Na₂SO₄ anidro. Existem dois tipos de extrações distintas por arraste de vapor d'água. Esta distinção é feita pela forma da qual se estabelece o contato da amostra com a água. A primeira é chamada de hidrodestilação, onde a amostra fica imersa na água numa caldeira. Na segunda, chamada de destilação por vapor de água, a amostra é mantida em um recipiente separado e o vapor de água que flui provém de um gerador (DELLA PORTA, 1999).

3.2.1.3 Extração com solventes orgânicos

Os óleos essenciais são extraídos, preferencialmente, com solventes apolares que, entretanto, extraem outros compostos lipofílicos, além dos óleos essenciais. Normalmente este método é utilizado para a extração de óleos-resina e resinas presentes nas plantas aromáticas (LIMA, 2006).

3.2.1.4 Prensagem (ou expressão) a frio

É empregado para extração de óleos essenciais de frutos cítricos. Os pericarpos desses frutos são prensados e a camada que contém o óleo essencial é, então, separada. Posteriormente, o óleo é separado da emulsão formada com água através de decantação, centrifugação ou destilação fracionada (LIMA, 2006).

3.2.1.5 Extração com CO₂ supercrítico

Esse método tem a vantagem de operar a baixas temperaturas, de não usar um solvente tóxico e de permitir certa seletividade dos compostos extraídos.

Nenhum traço de solvente permanece no produto obtido, tornando-o mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos. Para tal extração, o CO₂ é primeiramente liquefeito através de compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior ao seu ponto crítico (31°C) e pressurizado a uma pressão acima de 73 bar, pressão crítica. Nessa condição, o CO₂ atinge o estado supercrítico no qual sua difusividade é análoga à de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Uma vez efetuada a extração, faz-se o CO₂ retornar ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação (LIMA, 2006).

3.2.2 Variação sazonal dos óleos essenciais

Como já dito anteriormente a maior parte das propriedades medicinais das plantas é conferida por produtos oriundos do metabolismo secundário. Estes são produtos que embora não sejam necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação de sua espécie (DUARTE, 2004)

Atualmente, sabe-se que muitas dessas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação do produtor a seu meio, tais como defesa contra animais herbívoros e microrganismos, proteção contra a radiação UV, a atração de polinização ou animais dispersores de semente (SIMÕES, 2002).

Sendo assim, os metabólitos secundários das plantas podem variar consideravelmente dependendo de vários fatores tais como sazonalidade, índice pluviométrico, radiação solar, altitude, ritmo circadiano, altitude dentre

outros (**Figura 11**), sendo que a constância de concentração de metabólitos secundários é praticamente uma exceção (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Neste sentido, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante (KVIECINSKI, 2007). De acordo com Eloff (1999), o material vegetal, coletado em diferentes épocas do ano, pode conter possíveis compostos novos com atividades biológicas diferentes.

Por exemplo, plantas aromáticas que contêm frações voláteis e não voláteis podem apresentar a composição química destas duas frações influenciada pelas mudanças sazonais (KAMATOU et al., 2008). Além disso, alguns dos fatores apresentam correlação entre si e não atuam isoladamente, podendo influenciar em conjunto no metabolismo secundário, como por exemplo, desenvolvimento e sazonalidade; índice pluviométrico e sazonalidade; temperatura e altitude (GOBBO-NETO; LOPES, 2007)

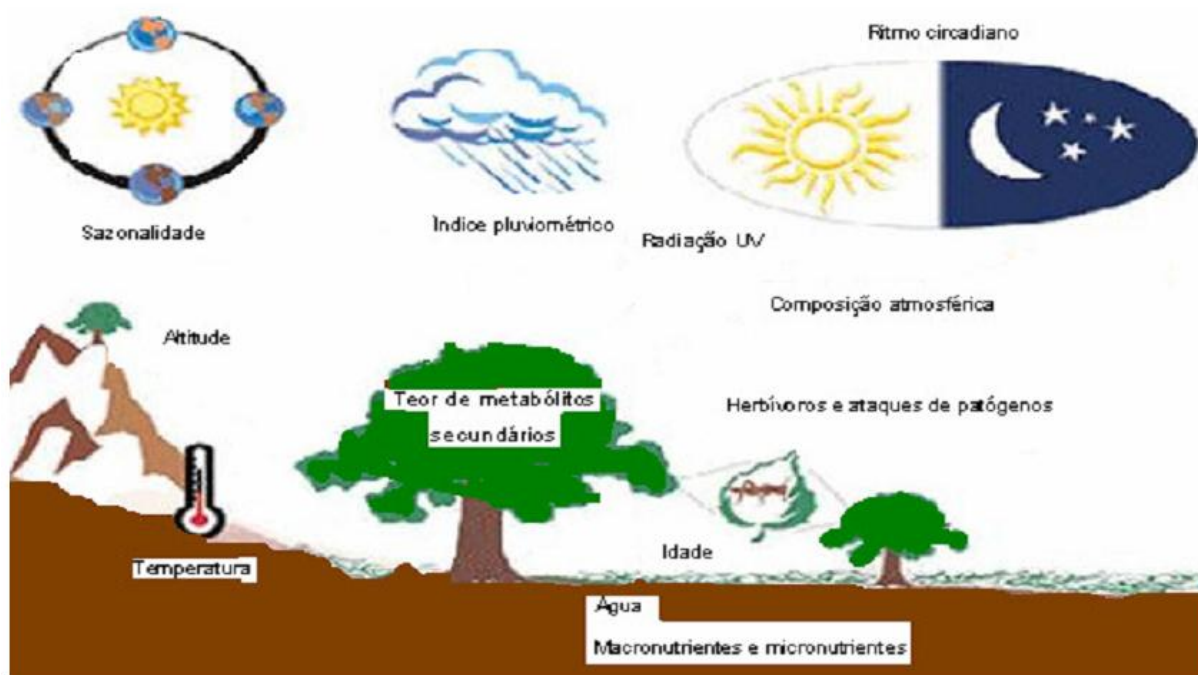


Figura 11. Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas. Fonte: Adaptado de Gobbo-Neto; Lopes, 2007

Sabendo-se dos inúmeros fatores que podem levar a variações no conteúdo de metabólitos secundários, fica clara a necessidade de estudos neste sentido.

3.2.3 Métodos cromatográficos de análise de óleos essenciais:

3.2.3.1 Cromatografia em camada delgada (CCD):

O perfil cromatográfico é característico para cada óleo e a CCD permite tenhamos várias informações sobre o óleo essencial em um curto espaço de tempo e usando pouca amostra (menos de 1 μ L) e pouco custo. Geralmente são usadas placas de sílica gel como fase fixa e como fase móvel uma série de sistemas solvente. A detecção é feita inicialmente em luz ultravioleta e depois a placa é revelada com reagente adequado para melhor visualização dos componentes do óleo; o valor do Rf também fornece informações sobre os compostos do óleo (SPITZER, 2004).

3.2.3.2 Cromatografia gasosa (CG) e espectrometria de massa (EM):

Esta técnica de separação baseia-se na distribuição dos componentes da amostra entre a fase estacionária (sólido ou líquido) e uma fase móvel (gás), sendo aplicada a compostos voláteis ou volatilizáveis. O gás da fase móvel tem a finalidade de transportar as moléculas a serem separadas através da coluna, sendo por isso conhecido como gás de arraste. Um detector é conectado na saída da coluna, onde é constatada a eficiência da separação pelo cromatograma registrado (BICCHI, 1999).

A técnica de impacto de elétrons (IE) é a mais comumente usada em espectrometria de massas, um espectrômetro de massas bombardeia moléculas na fase vapor com um feixe de elétrons de alta energia e registra o resultado do impacto dos elétrons como um espectro de íons separados na base da razão massa/carga (m/z). A maior parte dos íons formados tem carga unitária. Os espectros de massas são obtidos rotineiramente com o uso de um feixe eletrônico de energia de 70 eV. A maior parte dos íons desintegra-se em 10^{-10} a 10^{-3} s, dando, no caso mais simples, um fragmento carregado positivamente e um radical. Assim, forma-se certo número de fragmentos iônicos que podem ser posteriormente decompostos em fragmentos menores. (SILVERSTEIN, 1994).

No espectro de massas por impacto de elétrons, gerado por um computador na forma de um gráfico de barras, a abundância relativa dos picos é apresentada como porcentagem em relação aos picos bases (BICCHI, 1999).

3.3 Atividades biológicas

3.3.1 Atividade antioxidante

O oxigênio molecular e seus radicais são os reagentes mais importantes na bioquímica dos radicais livres nas células aeróbicas. O termo “espécies reativas de oxigênio” (ROS, sigla do inglês, reactive oxygen species) inclui os radicais livres contendo oxigênio, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) radical hidroxila (OH^{\cdot}) o radical peroxila (ROO^{\cdot}) e espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2). Estes são frequentemente gerados como subprodutos de reações biológicas ou por fatores exógenos que podem causar um grande número de desordens celulares ao reagir com lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. Estas espécies estão envolvidas tanto no processo de envelhecimento, como também em muitas complicações biológicas, incluindo inflamação crônica, problemas respiratórios, doenças neurodegenerativas, Diabetes mellitus, aterosclerose, doenças auto-imunes das glândulas endócrinas, carcinogênese e mutagênese (ANDRADE et al., 2007).

Neste sentido, os antioxidantes são substâncias utilizadas para inibir, prevenir ou retardar os danos provocados pelos processos oxidativos, podendo atuar através da inibição dos radicais livres (antioxidante primário) ou por outro mecanismo que não envolva a inibição direta dos radicais livres (antioxidante secundário). (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007).

A atividade antioxidante é uma característica individual de cada substância, definida como a soma dos mecanismos endógenos e exógenos disponíveis para garantir o equilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes (BIESALSKI, 1997).

Antioxidantes sintéticos como o butil-hidroxitolueno (BHT) e butil-hidroxianisol (BHA) têm sido amplamente empregados. Porém, acredita-se que estes antioxidantes possam estar associados aos processos de carcinogênese. As dúvidas em relação à segurança destes compostos incentivam o consumo de antioxidantes de origem natural, bem como a pesquisa por novos agentes

antioxidantes naturais, que tenham a mesma função e eficiência dos antioxidantes sintéticos (PASSOTTO, 1998).

Desta forma, a natureza química e a atividade de antioxidantes naturais têm sido investigadas, sendo que os antioxidantes isolados de diversas plantas são os polifenóis, os quais também demonstraram atividades biológicas como antibacteriana, anticarcinogênica, antiinflamatória, antialérgica e antiviral (LARSON, 1988).

A atividade antioxidante dos polifenóis é atribuída principalmente as suas propriedades redutoras, onde doam hidrogênio, neutralizando os radicais de oxigênio (ATOUI et al., 2005). Os compostos intermediários, formados pela ação de antioxidantes fenólicos, são estáveis devido à presença do anel aromático, o qual entra em ressonância, estabilizando a estrutura (HASLAM, 1996).

Acredita-se que a grande concentração e a diversidade de antioxidantes presentes nas plantas deve-se ao fato de que as mesmas precisam se proteger dos radicais livres gerados pelo estresse oxidativo, provocado pelos raios solares e pela exposição ao oxigênio (KVIECINSKI, 2007).

Vários métodos foram desenvolvidos para avaliar a atividade antioxidante de diferentes amostras, sendo que alguns métodos determinam a capacidade dos antioxidantes em sequestrar radicais livres gerados no meio reacional e outros avaliam a eficiência dos antioxidantes em inibir a peroxidação lipídica. Dentre os diferentes métodos existentes, destaca-se o método do DPPH• (2,2 –difetil– 1–picrilhidrazil) (MELO, 2006) que vem sendo amplamente empregado por ser considerado simples, rápido e sensível quando comparado a outros métodos, permitindo a realização de um “screening” de amostras com diferentes polaridades (ROESLER et al., 2007).

Este método baseia-se na redução dos radicais DPPH•, ou seja, na capacidade do radical livre em reagir com substâncias doadoras de H (**Figura 12**) (MOLYNEUX, 2004).

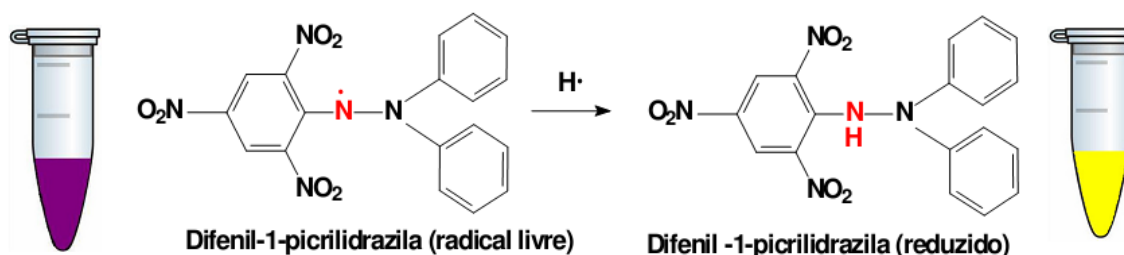


Figura 12. Modelo para avaliação da atividade antioxidante utilizando DPPH

A solução de DPPH possui uma coloração roxa intensa e a ação antioxidante de um extrato pode ser visualizada pelo progressivo descoloramento da solução, ao final do qual a mesma torna-se amarelada (MOLYNEUX, 2004).

3.3.2 Atividade antimicrobiana

Fleming, em 1929, desenvolveu o primeiro antibiótico em escala industrial. O termo antibiótico pode ser definido amplamente como substância biossintetizada por um ser vivo com capacidade de inibir microorganismos e/ou bloquear o crescimento e replicações celulares, em concentrações relativamente pequenas (FRANCO, 2005).

Algumas classificações são citadas por Franco (2005) para os antibióticos: de acordo com a origem química, farmacocinética e farmacodinâmica. E também de acordo com a atuação sobre o organismo invasor sem afetar o hospedeiro, chamado de específico e os inespecíficos capazes de matar ou inibir o crescimento microbiano *in vitro*, sendo considerados como anti-sépticos, germicidas, biocidas, esterilizantes e desinfetantes. O mesmo também classifica a atividade dos agentes antimicrobianos como bactericidas, quando matam o microorganismo durante a fase de crescimento logarítmico, onde há aumento da susceptibilidade devido ao aumento da atividade metabólica ou bacteriostático quando inibe o crescimento microbiano.

A susceptibilidade bacteriana de agentes antimicrobianos é testada *in vitro*, utilizando-se os princípios da difusão em Agar (BARRY, 1985). Os testes de avaliação antimicrobiana são padronizados pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards, (NCCLS, norma M2-A8, 2003, atual CLSI) para avaliar os agentes antimicrobianos convencionais. Nos testes de atividade antimicrobiana de

óleos essenciais, a norma proposta pelo NCCLS e também aquelas descritas nas farmacopéias, americana e brasileira não podem ser seguidas à risca, devido às propriedades de volatilidade, insolubilidade em água e composição complexa. Por isso, em testes de susceptibilidade microbiana (NASCIMENTO, 2007), deve-se ajustar a técnica usada, o meio de cultura, os microorganismos e o solvente ao óleo essencial.

3.3.2.1. Métodos de avaliação da atividade antimicrobiana

Os métodos de avaliação da atividade antimicrobiana se dividem basicamente em: métodos de difusão e métodos de diluição. O método de difusão, por sua vez, se divide em difusão por disco, difusão por cilindros, difusão por poços e bioautografia direta e indireta. Os ensaios de difusão são considerados qualitativos, pois apenas mostram se existe ou não atividade antibacteriana nos produtos naturais. Os métodos de diluição em tubos ou em placas podem ser considerados semiquantitativos, quando são testadas poucas concentrações do produto natural, por exemplo, três diluições e quantitativos onde se executam diluições seriadas do produto e se determina para este, a concentração inibitória mínima (VALGAS, 2007).

Esses métodos e suas variantes devem ser adaptados e escolhidos conforme as facilidades operacionais que permitem ensaios relativamente rápidos e simples, com custo compatível. É importante que as adaptações sejam testadas e padronizadas para se obter reprodutibilidade e garantir assim que os resultados tenham confiabilidade.

Mais recentemente, técnicas de diluição desenvolvidas em microplacas, possibilitam o uso de volumes reduzidos na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de produtos químicos que são de grande valia quando se tratam de produtos naturais, especialmente os de origem vegetal, extraídos em pequenas quantidades. Estas técnicas permitem a análise de vários compostos e de uma ampla variedade de microorganismos concomitantemente, utilizando pequenos volumes de amostra, com baixo custo e apresentando resultados produtivos. (DEVIENNE; RADDI, 2002; ELOFF, 1998).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Instrumentos utilizados

4.1.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (COSY, COLOC, HETCOR, Dept 135) foram realizados em espectrômetro Bruker DPX 200, operando a 200,13 MHz para ^1H e 50,32 MHz para ^{13}C , e espectrômetro Bruker DPX 400, operando a 400,13 MHz para ^1H e 100,62 MHz para ^{13}C , do Departamento de Química, da Universidade Federal de Santa Maria.

Para a preparação das amostras, utilizou-se quantidades entre 5-20 mg de amostra em 0,5 mL de solvente deuterado em tubos de 5 mm. O solvente utilizado para a análise das amostras foi clorofórmio deuterado (CDCl_3). Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm (partes por milhão) e as constantes de acoplamento (J) foram calculadas em Hertz (Hz). Para a calibração dos espectros utilizou-se como referência interna o TMS (δ 0,00) para os espectros de hidrogênio, e para a calibração dos espectros de carbono, utilizou-se CDCl_3 (δ 77,00) e DMSO-d_6 (δ 39,50).

4.1.2 Cromatografia Gasosa (CG)

As amostras de óleo essencial, armazenadas sob refrigeração ao abrigo da luz, em frascos de vidro âmbar com tampa rosqueada foram analisadas por meio de cromatografia em fase gasosa.

Estes experimentos foram realizados nos cromatógrafos a gás Varian 3800 e CP 3400. Os sinais foram detectados através de detector de ionização de chama (DIC), utilizando hidrogênio ultrapuro como gás de arraste (fase móvel), operando a uma pressão de 7 Psi, split 10, temperatura do injetor de 220 °C e do detector de 280 °C. As condições de cada injeção estão indicadas com os respectivos cromatogramas.

Os experimentos foram realizados utilizando-se coluna capilar de sílica fundida (CCSF) com dimensão 25 m x 0,25 mm, contendo fase estacionária apolar DB5 (Polimetilfenilsiloxano-5% fenil) utilizando programa de injeção, indicado nos cromatogramas. Os percentuais dos constituintes dos óleos analisados foram

obtidos pela área do pico, considerando todos os fatores de resposta do detector DIC iguais a um.

As amostras para CG foram preparadas utilizando-se alíquotas de 10 μL dos óleos voláteis dissolvidos em 500 μL de hexano para cromatografia. Em cada análise foram injetados 0,2 μL desta solução utilizando seringas Hamilton com capacidade de 10 μL .

4.1.3 Cromatografia Gasosa (CG) acoplada a Espectrometria de Massas (EM)

As análises de espectrometria de massa acoplada a cromatografia gasosa foram realizadas em aparelho Shimadzu QP-2010 equipado com coluna capilar 5MS de polaridade intermediária, 60 m, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura do filme. Foi utilizado como gás de arraste hélio ultrapuro, sendo a temperatura do injetor de 250 $^{\circ}\text{C}$ e a programação de análise com $T_{\text{inicial}} = 40$ $^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{final}} = 260$ $^{\circ}\text{C}$, rampa de aquecimento de 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, e com uma pressão de gás de arraste de 7 Psi. Os dados obtidos foram comparados com os dados da biblioteca NIST08 de espectros de massas.

As análises das amostras dos óleos voláteis de todas as espécies e a determinação de seus constituintes foram realizadas por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (CG-DIC), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e determinação do índice de retenção de Kovats (IK). Após análise dos tempos de retenção, índices de Kovats e espectros de massa das amostras analisadas, compararam-se esses dados com os existentes na literatura e identificaram-se os constituintes presentes no óleo.

4.1.4 Aparelho de Rotação Óptica Específica, Polarímetro

A rotação óptica dos óleos essenciais foi realizada em um polarímetro Perkin Helmer 341 automático com lâmpada de mercúrio com precisão de 0,05 graus.

4.1.5 Refratômetro

O índice de refração foi determinado em refratômetro Schmidt Haensch 20595, do Laboratório de Ensino de Química Orgânica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

4.2 Técnicas cromatográficas

4.2.1 Cromatografia em coluna (CC)

Nas purificações cromatográficas em coluna foram empregadas colunas de diversos tamanhos utilizando sílica-gel 230-400 e 70-230 mesh como fase estacionária. O sistema eluente empregado era hexano-acetato de etila com gradiente de polaridade.

4.2.2 Cromatografia em camada delgada (CCD) e preparativa (CCDP)

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi efetuada em cromato folhas de alumínio, como suporte e sílica gel 60 F₂₅₄ como adsorvente. As cromatoplasmas foram reveladas através de lâmpada ultravioleta ($\lambda = 254$ e 365 nm, Spectroline), nebulização com solução de álcool etílico e ácido sulfúrico (95:5 v/v) e 10% de vanilina em etanol, seguidas de tratamento térmico.

A cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foi realizada em placas de vidro de 20 x 20 cm, preparadas em laboratório, cobertas com sílica-gel, numa espessura de 0,75 mm, apresentando em sua composição indicador de fluorescência F254 e gipsa.

4.3 Solventes e reagentes purificados

Todos os solventes utilizados em extrações e cromatografia de camada delgada foram solventes de nível técnico que receberam tratamentos para melhorar suas condições tanto de umidade como também de possíveis contaminantes

Hexano: refluxado e destilado sobre sódio metálico.

Acetato de etila: seco sobre CaCl₂ e destilado.

Diclorometano: seco sobre CaCl₂ e destilado.

Éter etílico: destilado.

Éter de Petróleo: seco sobre CaCl₂ e destilado

Os solventes utilizados na preparação de amostras para cromatografia gasosa foram solventes de grau cromatográfico.

4.4 Identificação das plantas selecionadas para estudo

As espécies selecionadas foram coletadas em locais diversos e armazenadas no Herbário da Universidade Federal de Santa Maria, onde posteriormente foram identificadas pela bióloga botânica Prof.^a Taís do Canto Dorow. As coletas foram efetuadas no período de novembro de 2007 a agosto de 2011, sendo realizadas em diversas épocas do ano. O material testemunho das espécies coletadas está armazenado no Herbário da UFSM elencado na **Tabela 1**, abaixo:

Tabela 1. Exsicatas das espécies utilizadas para o estudo dos óleos essenciais.

Espécie:	Exsicata
<i>Calea clematidea</i>	SMDB 07348
<i>Acanthospermum australe</i> (Santa Maria)	SMDB 10047
<i>Acanthospermum australe</i> (Frederico Westphalen)	SMDB 10049
<i>Acanthospermum australe</i> (Três de Maio)	SMDB 10048
<i>Tagetes minuta</i> (Livramento solo sem nutrientes (SN))	SMDB 13711
<i>Tagetes minuta</i> -Livramento solo com nutrientes (CN)	SMDB 13712
<i>Tagetes minuta</i> (Florianópolis)	SMDB 13710
<i>Julocroton humilis</i>	SMDB 13713
<i>Nectandra megapotamica</i>	SMDB 13708
<i>Nectandra lanceolata</i>	SMDB 13709

4.5 Coleta dos materiais vegetais

4.5.1 Coleta dos materiais vegetais de *Calea clematidea*.

Os caules (**CCcaules**), folhas (**CCfolhas**), flores (**CCflores**) e casca de raízes (**CCraízes**) da amostra de *C. clematidea* foram coletados em Santana do Livramento-RS.

A coleta de toda a planta foi feita no mês de fevereiro dos anos de 2007 e 2009. A coleta dos caules e raízes foi feita nas outras estações dos mesmos anos mencionados. O peso do material vegetal de cada amostra coletada esta demonstrado na **Tabela 2**.

Tabela 2. Peso do material vegetal das diferentes partes de *C. clematidea* em diferentes épocas do ano.

Época de Coleta	CCfolhas	C.Cflores	CCcaules	CCraízes
Primavera	-	-	323g	290g
Verão	367g	178g	457g	259g
Outono	-	-	209g	287g

4.5.2 Coleta dos materiais vegetais de *Acanthospermum australe*

A espécie *Acanthospermum australe* foi coletada no mês de dezembro de 2010 em três cidades distintas: a) no município de Frederico Westphalen onde se separou a planta em raízes (**AaFWra**) e partes aéreas (**AaFWPA**); b) no município de Santa Maria onde se separou a planta em raízes (**AaSMra**) e parte aéreas (**AaSM PA**); c) no município de Três de Maio onde se separou a planta em raízes (**AaTM ra**) e partes aéreas (**AaTMPA**). A amostra de óleo essencial das raízes (**AaLajra**) da mesma espécie proveniente de Lajeado-RS foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Eduardo Miranda Ethur. O peso de material vegetal bruto de cada amostra coletada esta demonstrado na **Tabela 3**.

Tabela 3. Peso do material vegetal das diferentes partes e locais de coleta de *Acanthospermum australe*

Amostra	Peso
Aa FW ra	390g
Aa FW PA	455g
Aa TM ra	950g
Aa TM PA	806g
Aa SM ra	1003g
Aa SM PA	990g

4.5.3 Coleta dos materiais vegetais de *Tagetes minuta*

As partes aéreas da espécie *Tagetes minuta* foram coletadas nas cidades de Santana do Livramento-RS em dois solos diversos: um terreno deficiente em nutrientes (**SN**) e outro terreno rico em nutrientes (**CN**). Outra amostra foi coletada na cidade de Florianópolis-SC (**FL**). As coletas foram efetuadas no mês de outubro de 2010. O peso do material vegetal bruto está relacionado na **Tabela 4**.

Tabela 4. Peso do material vegetal dos diferentes locais de coleta de *Tagetes minuta*.

Amostra	Peso
(CN)	456g
(SN)	530g
(FL)	390g

Amostras da parte aérea de *T. minuta* do solo empobrecido (*SN*) e do solo com nutrientes (*CN*) de Santana do Livramento e a parte aérea da amostra de Florianópolis (*FL*)

4.5.4 Coleta dos materiais vegetais de *Julocroton humilis*

As amostras de folhas, caules, flores e raízes da espécie *Julocroton humilis* foram coletadas na cidade de São Francisco de Assis-RS. As coletas foram efetuadas no mês janeiro de 2008 e janeiro de 2010.

O material vegetal foi separado como extraídos seus óleos e analisados por cromatografia gasosa. Os resultados demonstraram não existir diferença significativa tanto de rendimento quanto de composição quando comparadas flores, folhas e caules da planta na extração de óleo essencial. Por este motivo a amostra foi tratada apenas como parte aérea. Não houve sucesso na obtenção de óleo essencial das raízes desta planta. Foram analisadas três amostras desta planta uma coletada em 2008 (**Jh08**) que foi reanalisada em 2010 (**Jh08d**), e outra coletada em 2010 (**Jh10**).

Na coleta de 2008 (**Jh08**) obteve-se 1807g de partes aéreas frescas enquanto que na coleta de 2010 (**Jh10**) obteve-se 1007g.

4.5.5 Coleta dos materiais vegetais de *Nectandra megapotamica*

As folhas e galhos da espécie *Nectandra megapotamica* foram coletados no campus da Universidade Federal de Santa Maria-RS (29°42'45''S 53°44'20''W).

As coletas foram efetuadas no período de outubro de 2010 a julho de 2011. Sendo assim as amostras foram então divididas em:

- **A:** amostras coletadas na primavera (outubro de 2010)
- **B:** amostras coletadas no verão (janeiro de 2011)
- **C:** amostras coletadas no outono (abril de 2011)
- **D:** amostras coletadas no inverno (julho de 2011)

O peso de planta bruta utilizado na extração está relacionado na **Tabela 5**.

Tabela 5. Peso do material vegetal das diferentes partes e épocas do ano de *N. megapotamica*

Época de Coleta	<i>N. megapotamica</i> folhas	<i>N. megapotamica</i> galhos
Primavera (A)	1005g	390g
Verão (B)	626g	270g
Outono (C)	777g	400g
Inverno (D)	262g	231g

4.5.6 Coleta dos materiais vegetais de *N. lanceolata*

As folhas e galhos da amostra de *N. lanceolata* foram coletados em Santa Maria-RS no mês de junho de 2011. O peso do material vegetal fresco utilizado foi de 634 g de folhas e 214g de galhos.

4.6 Extração dos óleos essenciais de cada uma das amostras vegetais

A extração dos óleos essenciais presentes nos vegetais em estudo foi realizada por hidrodestilação empregando um aparelho de Clevenger modificado (**Figura 13**), conforme determinado pela Farmacopéia Bras.(1988). Em balão de

fundo redondo foram colocados a planta fresca pulverizada com quantidade de água destilada suficiente para encobrir o material vegetal.

Em seguida, adaptou-se o aparelho de Clevenger ao balão, onde foi preenchido com água destilada a parte do tubo graduado e do tubo retorno.



Figura 13. Aparelho de Clevenger modificado, utilizado na extração dos óleos essenciais.

Na sequência, foi promovido o aquecimento do balão através de uma manta térmica, deixando destilar por 7 horas. Ao final do ensaio, os óleos essenciais destilados foram secos com sulfato de sódio anidro, filtrados e estocados em frasco âmbar tipo vial sob refrigeração a 4 °C, obtendo-se assim os respectivos óleos essenciais.

4.7 Determinação das propriedades físicas dos óleos voláteis:

4.7.1 Polarimetria (α)

A rotação ótica dos óleos essenciais foi realizada em polarímetro Perkin Helmer 341 automático com lâmpada de mercúrio com precisão de 0,05 graus, em cubeta de 10 dm de comprimento, utilizando diclorometano como solvente. Os experimentos foram realizados na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

4.7.2 Índice de refração (η)

O índice de refração foi determinado em refratômetro Schmidt Haensch 20595, do Laboratório de Ensino de Química Orgânica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os valores obtidos tiveram correção de -0,0004 unidades/°C para cada grau de temperatura abaixo de 12°C, que era a temperatura ambiente no momento da análise.

4.7.3 Densidade (d)

As densidades foram determinadas a partir da relação $d=m.V^{-1}$ onde d densidade, m-massa e V-volume. Foram pesados 10 μ L de cada óleo essencial e calculada a densidade com a ajuda da massa obtida. As amostras foram pesadas cinco vezes e as densidades são uma média dos valores obtidos.

4.8 Análise dos óleos voláteis das espécies

As análises de todas as amostras e a determinação dos seus constituintes foram realizadas em cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (CG-DIC), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e determinação do índice de retenção de Kovats (IK). De posse do tempo de retenção, índices de Kovats e dos espectros de massas dos constituintes dos óleos, comparou-se com a literatura existente, identificando-se cada constituinte.

Os experimentos de CG foram realizados utilizando-se colunas capilares de sílica fundida (CCSF) com dimensões: 25 m x 0,25 mm, contendo fase estacionária apolar DB-5 (Polimetilfenilsiloxano-5% fenil), utilizando o mesmo programa de injeção, indicados nos respectivos cromatogramas. Utilizou-se também uma coluna

capilar 5MS de polaridade intermediária, 60 m, 0.32 mm de diâmetro interno e 0,25 um de espessura do filme. Os percentuais dos constituintes dos óleos analisados foram obtidos pela área do pico, considerando todos os fatores de resposta do detector DIC iguais a um.

4.8.1 Determinação do índice de retenção de Kovats para os constituintes dos óleos voláteis

Em cromatografia expressar os dados de tempo de retenção não é trivial, porque estes são muito dependentes de condições operacionais. Vários sistemas foram desenvolvidos, sendo um dos mais lógicos para generalizar os dados de retenção o de expressa-los em uma escala de índices de retenção foi proposto pela primeira vez por E. Kovats em 1958.

Os índices de retenção de Kovats foram determinados através da injeção de uma mistura de *n*-alcanos (C₈ a C₂₆) com tempo de retenção e ordem de eluição conhecidos, juntamente com os constituintes que tiveram seus índices calculados. Em condições de variação linear de temperatura a fórmula utilizada é a seguinte:

$$I_{r_i} = 100 n + 100 \Delta n \frac{tr_i - tr_n}{tr_m - tr_n}$$

onde:

I_{r_i} = índice de retenção de *i*

n = número de carbonos do alcano que elui antes de *i*

m = número de carbonos do alcano que elui depois de *i*

Δn = número de carbonos do alcano que elui depois de *i* menos número de carbonos do alcano que elui antes de *i*

tr_i = tempo de retenção de *i*

tr_n = tempo de retenção do alcano que elui antes de *i*

tr_m = tempo de retenção do alcano que elui depois de *i*.

Os índices de retenção de Kovats (IK) dos constituintes dos óleos foram determinados e comparados com os padrões de igual índice de retenção, encontrados na literatura (ADAMS, 2001).

4.9 Reação para obtenção do padrão Timol metil éter para análise do óleo de *Calea clematidea*

Para fazer a análise dos óleos da espécie *C. clematidea* se fez necessária a obtenção do padrão Timol metil éter de modo sintético. Esta reação foi realizada no laboratório do Prof Enrique Larghi (Instituto de Química, Rosario-Argentina), utilizando-se timol como reagente de partida, sendo as condições reacionais descritas a seguir na **Figura 14**. O produto foi analisado através de cromatografia gasosa apresentando 93% de pureza (CG). Rendimento: 87 %. Este padrão sintético foi posteriormente coinjectado com os óleos essenciais da planta a serem analisados.

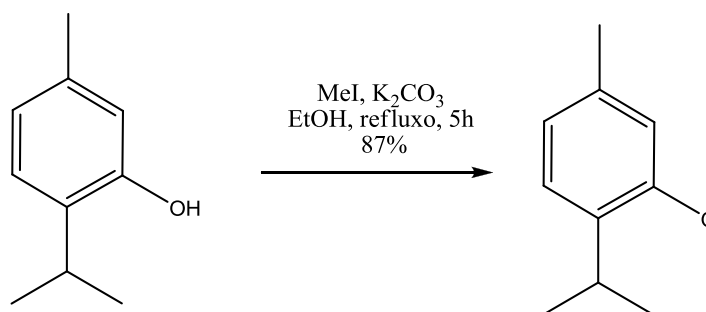


Figura 14. Síntese do timol metil éter

4.10 Isolamento dos componentes majoritários do óleo das folhas de *N. megapotamica*

Após a extração do óleo essencial das partes aéreas de *N. megapotamica*, foram separadas 500 mg deste para fracionamento através de CC, utilizando-se como sistema eluente hexano/acetato de etila em diferentes gradientes. Desta maneira foram obtidas quatro frações principais, sendo estas analisadas por CG.

Destas quatro frações, a terceira (**NmFr3**) que continha 115 mg, quando analisada por CG apresentou 70% do composto majoritário. A partir deste resultado, esta fração **NmFr3** foi submetida a análise por ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C, onde observou-se a presença de uma mistura de dois compostos.

Uma alternativa para separar tais compostos presentes na **NmFr3** poderia ser o uso de colunas de CG quirais. Desta maneira, foram testadas as colunas LIPODEX E 25 m (2-o-Bc-2,6-o-Pe- γ -CD) e 6-Bn-2,3-Pe- β -CD, nas condições 35-180°C e com taxas de aquecimento da coluna variando de 1,5 a 4 °C por minuto, todas sem sucesso.

Outra alternativa preconizada para a separação dos compostos foi a reação de acetilação, primeiramente desenvolvida com o reagente anidrido acético, mas mais uma vez sem atingir o objetivo. Este objetivo só foi alcançado com o uso de anidrido trifluoracético (TFAA).

4.10.1 Separação dos dois compostos majoritários do óleo das folhas de *Nectandra megapotamica* contidos em NmFr3 utilizando-se TFAA

Após o insucesso das técnicas mencionadas anteriormente na separação dos compostos majoritários desta espécie, utilizou-se uma reação de acetilação com anidrido trifluoracético (TFAA). A reação de acetilação foi realizada utilizando-se 100mg de **NmFr3** que foi dissolvida em 5 mL de diclorometano e acrescida 100 μ L de TFAA . A reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por duas horas e acompanhada através de CCDP utilizando-se como eluente, hexano e acetato de etila (9:1).

Encerrada a reação, evaporou-se o diclorometano e o anidrido residuais, obtendo-se 80 mg de um óleo que foi analisado através de cromatografia gasosa. Este óleo continha os dois terpenos principais agora separados. Os dois terpenos foram purificados através de CCD, utilizando-se como eluente, hexano e acetato de etila (96:4), obtendo-se duas frações de 20 mg cada, denominadas **PF1** e **PF2**.

4.10.2 Preparação do extrato hexânico das folhas de *Nectandra megapotamica*

Para constatar se os sesquiterpenos PF1 e PF2 que foram identificados nos óleos de *N. megapotamica*, eram produtos formados por aquecimento durante o processo de hidrodestilação, realizou-se a extração utilizando hexano a frio das folhas desta espécie. Foram pesadas 356g de folhas frescas cortadas grosseiramente com um auxílio de uma tesoura de poda para serem submetidas a extração a frio, em hexano (quantidade suficiente de solvente para cobrir todo

material vegetal) até a exaustão. As folhas embebidas em metanol foram filtradas em papel filtro e a fração obtida teve o solvente evaporado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, em banho-maria com temperatura variando entre 45–60 °C obtendo-se 7 g de extrato hexânico de *N. megapotamica*.

4.11 Isolamento do componente majoritário dos óleos das raízes de *A. australe*

Partindo de 500 mg de óleo essencial das raízes da amostra de *A. australe* coletadas em Santa Maria (**AaSMra**) utilizou-se CC para a separação dos constituintes majoritários do referido óleo. Utilizando o sistema eluente hexano/acetato de etila foram obtidas quatro frações. Todas as frações foram analisadas por CCD e CG, sendo a fração 2 (206mg) a que continha o componente majoritário, sendo nomeada de **AaFr2** com 80% de pureza.

A mesma mistura (**AaFr2**) majoritária e comum a todas as amostras estudadas desta espécie foi então purificada por cromatográfica em camada delgada preparativa (CCDP). E depois da purificação foi nomeada **AA1** e analisada por CG, apresentando 93% de pureza. Posteriormente a mesma foi encaminhada para análise de RMN.

4.11.1 Hidrólise alcalina da mistura de Timol isobutirato e Carvacrol isobutirato (**AaFr2**) extraídos de *Acanthospermum australe*

Após o procedimento de isolamento indicado no tópico anterior, partiu-se para o procedimento de hidrólise de **AaFr2**: em 15 mL de metanol anidro sob banho de gelo colocou-se 20 mg (80 mmol) de sódio metálico e após o completo consumo do metal adicionou-se 140 mg da mistura **AaFr2**. A reação foi mantida sob agitação em banho de gelo e acompanhada por CCD utilizando o sistema eluente hexano/acetato de etila 10%.

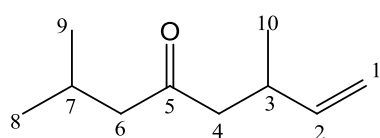
Após o total consumo dos ésteres, a reação foi encerrada pela neutralização do metóxido de sódio formado com HCl 1M até pH 6. Posteriormente, o metanol foi evaporado e o resíduo extraído três vezes com 15 mL de diclorometano. As fases orgânicas combinadas foram secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e evaporadas. O óleo resultante agora denominado **AaRaSM hidrolisado** foi pesado e analisado em CG-EM onde se constatou a presença dos dois terpenos

correspondentes após a hidrólise: timol e carvacrol na proporção de aproximadamente 2 para 1. O rendimento da reação foi de 83%.

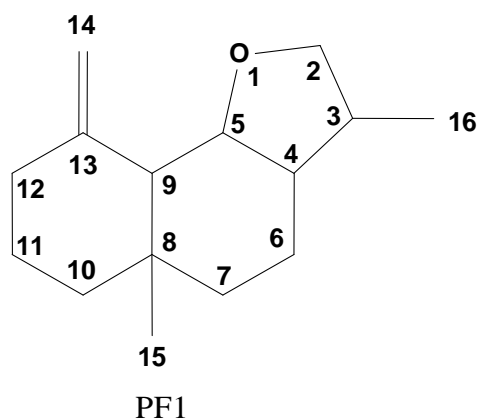
4.12 Isolamento do componente majoritário do óleo de *T. minuta* CN

Após a extração do óleo essencial das partes aéreas de *T. minuta* **CN**, o óleo obtido foi submetido a um fracionamento através de CC, utilizou-se como sistema eluente hexano/acetato de etila (100:0 a 95:5). Desta maneira foram obtidas 20 frações, destas a **Fração 9** continha o componente majoritário com pureza de 95% (CG). Este componente foi identificado através dos índices de retenção de Kovats e RMN de ^1H e ^{13}C ..

4.13 Dados dos compostos isolados

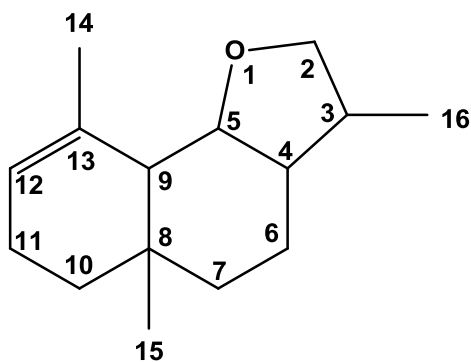


Diidrotagetona: 300 mg, líquido incolor; $[\alpha]^{25} D: +7.5$ (em CHCl_3 , $c = 0,002$). Rf: 0,61 cm em Hexano/Acetato de Etila (97,5: 2, 50); ^1H RMN (CDCl_3) δ 5,64-5,58 (m, 1H, 2-CH), 4,91-4,80 (m, 2H, 1- CH_2), 2,64-2,60 (m, 1H, 3-CH), 2,30 (d, $J=6,46$ Hz, 2H, 4- CH_2), 2,17 (d, $J=6,86$ Hz, 2H, 6- CH_2), 2,07-2,00 (m, 1H, 7-CH), 0,91 (d, 3H, $J=6,46$ Hz, 10- CH_3), 0,81 (d, 6H, $J=6,86$ Hz, 8- CH_3 e 9-CH); ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 209,924 (C-5), 142,875 (C-2), 112,899 (C-1), 52,381 (C-6), 49,806 (C-4), 33,129 (C-3), 24,378 (C-7), 22,486 (C-8 e C-9) e 19,664 (C-10).



PF1: 19 mg, líquido incolor; $[\alpha]^{25} D: -33$ (em CHCl_3 , $c = 0,002$). Rf: 0,53 cm em Hexano/Acetato de Etila (96: 4), ^1H RMN (CDCl_3) δ 4,77 (d, 1H, $J=1,5\text{Hz}$, H-14), 4,27 (dd, 1H, $J=7,2\text{Hz}$, $J=10,2\text{Hz}$, H-5), 4,04 (t, 1H, $J=8,1\text{Hz}$, H-2'), 3,29 (t, 1H, $J=3,5\text{Hz}$, H-2:), 2,34 (m, 1H, H-12'), 2,25 (m, 1H, H-3), 2,00 (m, 1H, H-12), 1,89 (m, 1H, H-4), 1,87 (m, 1H, H6'), 1,79 (d, 1H, $J=10,4$ Hz, H), 1,65 (m, 1H H-6), 1,58 (m, 2H, H-11), 1,385 (m, 1H, H-7), 1,35 (m, 1H, H-7') 1,29 (m, 1H, H-10), 1,2 (m, 1H, H-10'), 0,99 (d, 3H, $J=6,4\text{Hz}$, H-16), 0,73 (s, 3H, H-15), de ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 147,088 (C-13), 107,298 (C-14), 76,442 (C-5), 73,764 (C-2), 51,592 (C-9), 44,969 (C-4),

41,87 (C-10), 37,574 (C-12), 36,835 (C-8), 35,622 (C-7), 34,647 (C-3), 23,59 (C-11), 19,551, (C-6), 16,395 (C15), 15,589 (C-16).



PF2

PF2 : 18 mg, líquido incolor; $[\alpha]^{25}_D$: - 98 (em CHCl_3 , $c = 0,002$). Rf: 0,62 cm em Hexano/Acetato de Etila (96: 4), ^1H RMN 5,34 (dd, 1H, $J=1,2\text{Hz}$, $J=2,7\text{Hz}$, H-12), 4,05 (m, 1H, H-5), 4,02 (t, 1H, $J=3,4\text{Hz}$, H-2'), 3,29 (t, 1H, $J=8,5\text{Hz}$, H-2), 2,20 (m, 1H, H-3), 2,05 (m, 1H, H-11'), 1,98 (dtd, 1H, $J=2,1\text{Hz}$, $J=4,2\text{Hz}$, $J=6,2\text{Hz}$, H-4), 1,90 (m, 1 H, H-

9), 1,82 (m, 1H), 1,22 (m, 1H, H-10), 1,00 (d, 3H, $J=6,5\text{Hz}$, H-16), 0,79 (s, 3H, H-15), 1,89 (m, 1H, H-6'), 1,74 (m, 1H, H-11), 1,65 (m, 1 H, H-6), 1,34 (m, 1H, H-7'), 1,30 (m, 1H, H-7), 1,26 (m, 1H, H-10'), ^{13}C RMN (CDCl_3) 135,339 (C-13), 122,154 (C-12), 79,226 (C-5), 73,049 (C-2), 47,090 (C-4), 45,933 (C-9), 37,943 (C-7), 35,561 (C-3), 35,334 (C-10), 33,653 (C-8), 23,240 (C14), 22,911 (C-11), 20,450 (C-6), 16,418 (C-16), 15,935 (C-15).

4.14 Determinação da atividade antimicrobiana “in vitro”.

A atividade antimicrobiana dos óleos foi investigada, utilizando cepas de ATCC (American Type Culture Collection) e uma cepa isolada concedida pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Farmácia da UFSM.

BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS

Staphylococcus aureus ATCC 6538p

Staphylococcus epidermidis ATCC 12228

Bacillus subtilis ATCC 6633

BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS:

Salmonella setubal ATCC 19796

Escherichia coli ATCC 25792

Klebsiella pneumoniae ATCC 10031

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

FUNGOS (LEVEDURAS):

Candida albicans ATCC 10231

Sacharomyces cerevisiae ATCC 2601

Candida dubliniensis Isolado clínico SM-26

Cryptococcus neoformans ATCC 28952

Como substâncias de referência, foram utilizados os antibióticos cloranfenicol para bactérias e nistatina para fungos.

4.14.1 Meios de cultura empregados

Meio ágar nutriente: meio utilizado para o repique de bactérias.

Fórmula (g L⁻¹)

Ágar bacteriológico 15,0

Cloreto de sódio 8,0

Extrato de carne 3,0

Peptona de gelatina 5,0

Meio ágar sabouraud dextrosado: meio utilizado para repiques de fungos

Fórmula (g L⁻¹)

Ágar 15,0

Dextrose 40,0

Peptona de carne 5,0

Peptona de caseína 5,0

Meio caldo sabouraud dextrosado: meio utilizado para o cultivo de fungos nos ensaios de concentração inibitória mínima.

Fórmula (g L⁻¹)

Dextrose 40,0

Peptona de carne 5,0

Peptona de caseína 5,0

Todos os meios foram preparados de acordo com as instruções do fabricante em água recentemente destilada e esterilizados em autoclave a 121 °C, 1 atm., por 15-20 minutos.

4.14.2 Preparo das suspensões microbianas (inóculo)

As culturas dos microorganismos utilizados foram mantidas em tubos de ensaio com ágar inclinado, foram realizadas manutenções periódicas através de repicagem.

Para a preparação da suspensão microbiana utilizaram-se repiques recentes, retirando-se uma alíquota da cultura, com auxílio de alça de platina, sendo esta suspendida em uma solução salina previamente esterilizada. A suspensão obtida foi padronizada de acordo com a escala nefelométrica de Mc Farland em 0,5 que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ (Unidades Formadoras de Colônia por mL).

4.14.3 Determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) pelo método de microdiluição

Empregou-se a técnica descrita pela NCCLS120, com algumas modificações (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003) os ensaios foram realizadas em placas estéreis de 96 micropoços (Costar, código 3596), onde efetuou-se uma série de diluições das amostras em meio caldo caseína de soja e sabouraud contendo 2% do surfactante Tween 80, iniciando da concentração de 20 mg mL⁻¹ de amostra. Os poços foram então inoculados com a suspensão microbiana com intensa homogeneização, e as placas foram incubadas por 24 horas a 35° C para bactérias e por 48 horas a 25° C para fungos. Após o período de incubação, observou-se o crescimento microbiano, indicado pelo aparecimento de turvação, possibilitando assim, a verificação da CIM.

As culturas que não apresentaram crescimento nos poços foram usadas para inocular placas de Petri contendo meio ágar onde foram determinados a CBM (Concentração Bactericida Mínima) e CFM (Concentração Fungicida Mínima), sendo consideradas como: a menor concentração da substância onde não ocorre crescimento microbiano. Testes em branco foram efetuados simultaneamente e as amostras foram realizadas em triplicata.

4.15 Determinação da atividade antioxidante

Tendo o objetivo de avaliar a atividade antioxidante dos óleos essenciais, foram utilizados dois processos. Em um ensaio qualitativo, aplicou-se o método do

radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) descrito por Hostettmann et al., 2003, onde o ensaio é feito através de um “screening” das amostras testadas. Outro método empregado foi o método quantitativo realizado pela medida da leitura da absorbância das amostras contra uma amostra em branco e um padrão (BHT).

4.15.1 Método do Radical Livre – Ensaio Qualitativo

O método fundamenta-se na redução do radical DPPH (avalia a capacidade dos compostos testados em ser doadores de hidrogênio - ação antioxidante). A solução do DPPH possui uma coloração violeta que descolore progressivamente tornando-se amarelada, permitindo assim observar a ação antioxidante da amostra testada.

Para a execução deste ensaio, as amostras a serem testadas foram solubilizadas em metanol e aplicadas pontualmente em cromatoplasmas na concentração de 30 µg/mL e eluídas em solventes adequados conforme suas polaridades. O DPPH (solução metanólica de 0,2%) é aplicado através de borrifamento sobre as cromatoplasmas que ficam com a coloração violeta do DPPH.

Estas são, então, deixadas em repouso por 30 minutos. As amostras testadas, quando ativas, descolorem o DPPH formando manchas claras sobre a placa violeta, que são avaliadas como atividade antioxidante positiva.

4.15.2 Método do Radical Livre – Ensaio Quantitativo

Para esta determinação, uma solução estoque de 6 mg.mL⁻¹ (30 mg de amostra em 5 mL de MeOH ou EtOH) foi preparada e as concentrações finais de 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,6 e 7,8 µg.mL⁻¹ foram obtidas, conforme descrito a seguir (**Esquema 3**).

Em cada tudo de ensaio foram colocados 2 mL de metanol. Ao primeiro tudo de cada diluição (500 µg.mL⁻¹), denominado tubo 1, adicionou-se 1 mL da solução da amostra (6 mg.mL⁻¹). O referido tubo foi homogeneizado, e passou-se 1 mL para o tubo 2 e assim sucessivamente para os demais tubos até o último tubo (7,8 µg.mL⁻¹), de onde, após a homogeneização, foram retirados 1 mL da solução que foi descartada. Após a realização desta diluição, acrescentou-se a cada um dos tubos 0,5 mL de DPPH 0,004% em metanol e as amostras foram incubadas a temperatura

ambiente, sob o abrigo da luz por 30 minutos. O decréscimo da absorvância foi medido em espectrofotômetro a $\lambda=517$ nm. O **Esquema 3** representa o teste realizado.

Como padrão positivo da análise utilizou-se o BHT (Butil-hidróxi-tolueno) nas mesmas concentrações das amostras. Para cada concentração de amostra testada foi descontado o valor obtido para o branco (amostra contendo a mesma quantidade de metanol, sem DPPH). Estas são, então, deixadas em repouso por 30 minutos. As amostras testadas, quando ativas, descolorem o DPPH formando manchas claras sobre a placa violeta, que são avaliadas como atividade antioxidante positiva.



Esquema 3. Análise da atividade antioxidante com DPPH.

A porcentagem de inibição para avaliar a atividade de captura do radical pelas amostras testadas é calculada pela fórmula demonstrada na equação abaixo, onde **Ac** é a absorvância da solução controle e **Aa** é a absorvância da amostra testada no tempo de 30 minutos.

$$\% \text{ inibição} = [(Ac - Aa) / Ac] \times 100$$

Foi obtida, através de regressão linear a partir das médias das porcentagens, a EC50 (concentração que causa 50% de inibição do radical livre DPPH).

5 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Nos seis subcapítulos seguintes serão apresentados e discutidos os resultados obtidos de composição química, atividade antimicrobiana e antioxidante para as plantas das três famílias estudadas no decorrer deste trabalho, sendo os mesmos divididos e apresentados por planta estudada.

5.1. Estudo dos óleos essenciais de *Calea clematidea*

Família: Asteraeae

A finalidade do estudo desta espécie foi a comparação do óleo essencial das diferentes partes da planta, como folhas, flores, caules e casca de raízes. Além disso, foram coletadas amostras em diferentes épocas do ano para a verificação da possibilidade de variações sazonais.

Para isso, folhas e flores, que já haviam sido estudadas anteriormente (FLACH, 2002) foram novamente coletadas, e seus óleos essenciais novamente extraídos, com o objetivo de compará-los com os óleos essenciais de caules e raízes, partes da planta ainda não estudadas. Das raízes foram utilizadas apenas as cascas, sendo o lenho desprezado.

5.1.1 Rendimento e propriedades físicas dos óleos voláteis de *Calea clematidea*

Os dados físicos dos óleos obtidos das amostras da espécie em questão estão na **Tabela 6**. As amostras **CCcaule**, **CCraízes**, **CCflores** apresentaram cor amarela, enquanto a amostra de óleo **CCfolhas** apresentou coloração verde. O rendimento dos óleos em diferentes épocas do ano está relacionado na **Tabela 7**.

Tabela 6. Dados físicos dos óleos essenciais de *Calea clematidea*

Amostra	d	α [0,05; CH ₂ Cl ₂]	η
Cc Caule	0,9122	-30	1,5025
Cc Folha	0,9233	33	1,5906
Cc raízes	0,9000	-25	1,5670
Cc Flores	0,7600	ND	1,4456

Amostras coletadas no verão, R – rendimento em porcentagem; d - densidade em g.mL⁻¹, α - rotação ótica e η - índice de refração. ND-não determinado

Tabela 7. Comparação dos rendimentos entre os diferentes óleos essenciais de *C. clematidea* em diferentes épocas do ano.

Época de Coleta	<i>C.clematidea</i> folhas	<i>C.clematidea</i> flores	<i>C.clematidea</i> caules	<i>C.clematidea</i> casca de raízes
Primavera	-	-	0, 22%	0, 86%
Verão	1,3%	0,86 %	0, 14%	0, 59%
Outono	-	-	0, 13%	0, 48%

Observando-se a **Tabela 7**, no verão (dezembro-janeiro), antes da época de floração (Março-Abril), as folhas produzem a maior quantidade de óleo essencial, decaindo na época de floração. Da mesma maneira, o verão (fevereiro-março) foi a época em que se observou maior concentração de óleo nas flores. A primavera foi a estação em que as cascas das raízes apresentaram maior concentração de óleo essencial.

5.1.2 Análise dos óleos essenciais de caules de *C. clematidea*.

A análise dos quatro óleos por cromatografia gasosa indicou uma diferença quantitativa e qualitativa na composição entre as amostras (**Tabela 8**). Por esta razão, os dados destas amostras foram tratados separadamente. Quanto a composição química dos óleos, observa-se uma diferença significativa entre as folhas e demais partes da planta.

5.1.2 1 Cromatogramas dos óleos essenciais de cascas de raízes de *C. clematidea*

As figuras a seguir mostram os perfis cromatográficos dos óleos voláteis de caules de *C. clematidea*. A **Figura 15** ilustra o perfil cromatográfico do óleo (A), enquanto que os cromatogramas B e C mostram apenas expansões de A para melhor visualização.

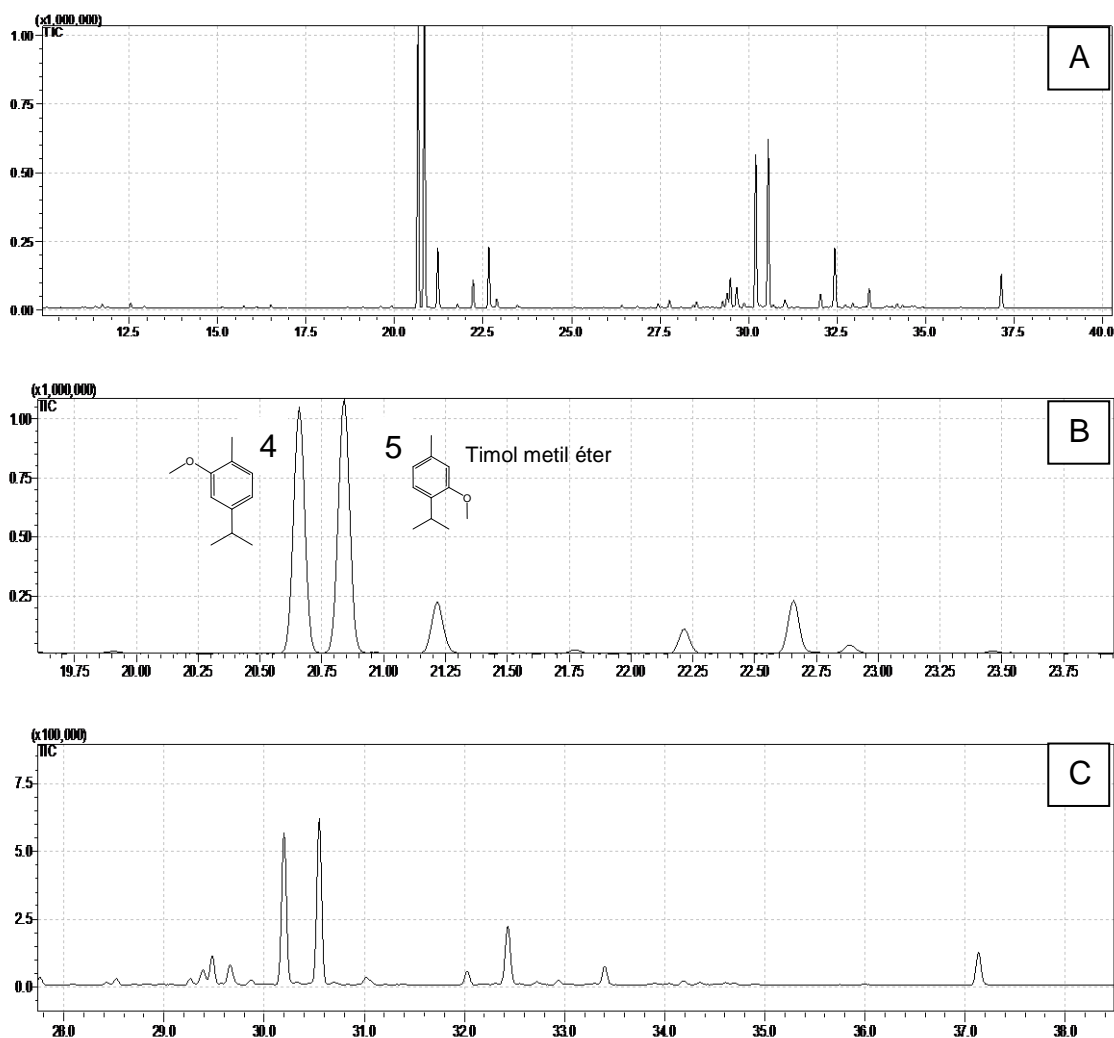


Figura 15. Perfil cromatográfico do óleo dos caules de *C. clematidea*. (A). Perfil cromatográfico do óleo dos caules de *C. clematidea* ampliação até 29 minutos (B). Perfil cromatográfico do óleo do caule de *C. clematidea* ampliação depois de 29 minutos (C). Utilizando coluna DB5, CCSF de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50 °C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4 °C min⁻¹.

5.1.2.2 Cromatogramas dos óleos essenciais de cascas de raízes de *C. clematidea*.

Conforme se pode observar na **Tabela 8**, o óleo das cascas é constituído principalmente pelos componentes **4 e 5** (Ca 65 %), seguido de 6-metil-ionona (14,85%). Este último composto só pode ser encontrado no óleo da flor, em pequenas quantidades (1,6%).

Os cromatogramas mostrados a seguir (**Figura 16**) ilustram o perfil cromatográfico do óleo essencial das cascas (A) e ampliação deste cromatograma (B).

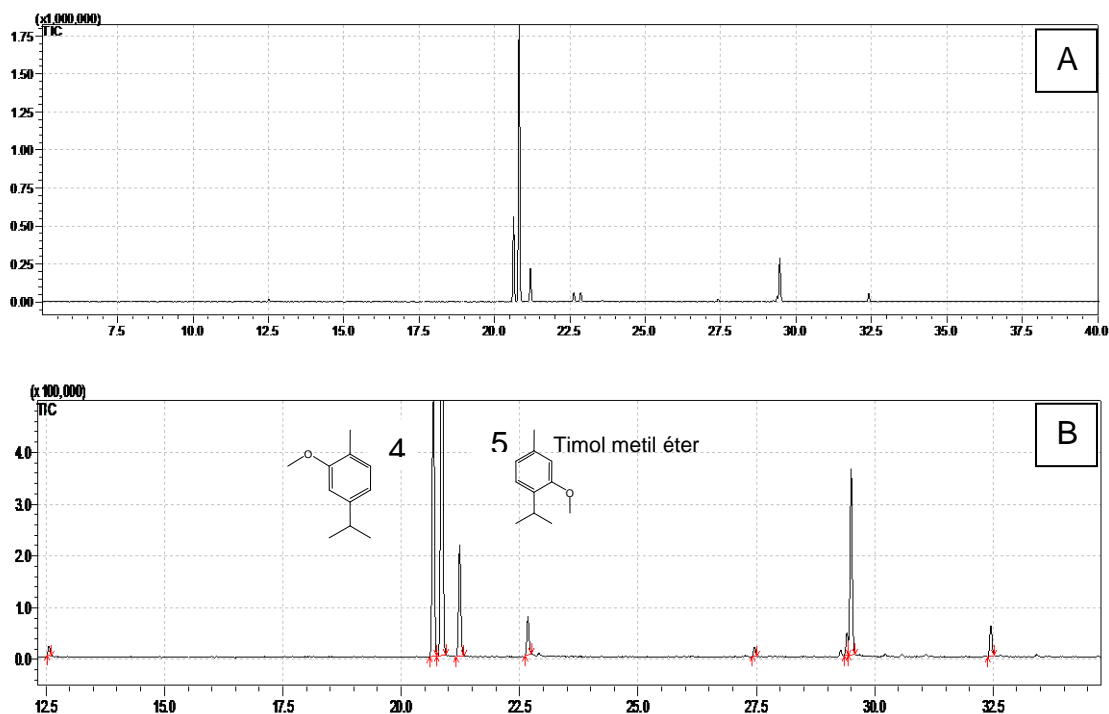


Figura 16. Perfil cromatográfico do óleo das cascas das raízes de *C. clematidea* (A). Perfil cromatográfico do óleo do caule de *C. clematidea* ampliação (B). Utilizando coluna DB5, CCSF de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50 °C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4°C min⁻¹.

5.1.2.3 Elucidação do terpeno **5** do óleo dos caules e raízes de *C. clematidea*

Inicialmente teve-se dificuldades em se elucidar inequivocamente as estruturas dos componentes **4 e 5** do óleo essencial (**Tabela 8**), utilizando-se apenas de CG-EM, devido a semelhança estrutural dos componentes. A sugestão de estruturas era de que se tratava de compostos fenilpropanóides, derivados do timol. Pela falta

de padrões para usar como reforço em CG, utilizou-se um derivado metilado do timol (timol metil-éter), obtido por síntese (ítem 4.9). A coinjeção do óleo essencial com este padrão mostrou que um dos componentes do óleo, o terpeno **5**, tratava-se de timol metil-éter (Figura. 17).

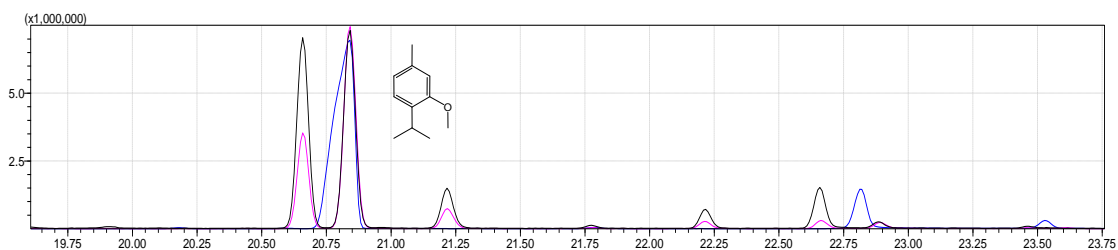


Figura 17. Cromatograma do Timol metil éter padrão (em azul), do óleo dos caules de *C. clematidea* (em preto) e da coinjeção dos mesmos (em rosa).

Também foi coinjetado o óleo das cascas das raízes com o padrão sintético (Figura 18), onde o terpeno **5** deste óleo equivale ao mesmo composto padrão em questão

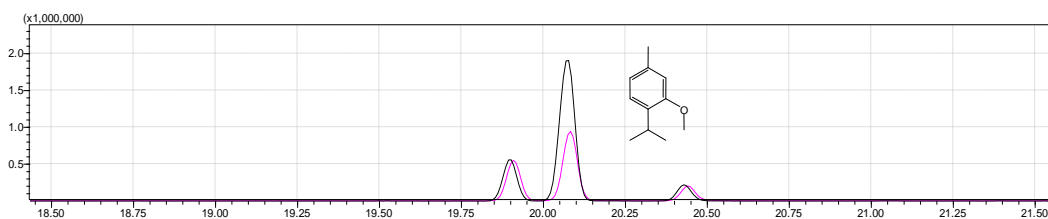


Figura 18. Cromatograma com a comparação entre óleo das raízes de *C. clematidea* (em rosa) e a coinjeção com o padrão timol metil éter (em preto).

Com a comprovação de que o componente **5** tratava-se do Timol metil éter, o componente **4** foi identificado como sendo outro fenilpropanóide, conhecido como 2-isopropil-4-metilanol.

A Figura 19 a seguir mostra o cromatograma do produto obtido, bem como seu espectro de massas comparado com o espectro da biblioteca do aparelho de CG-EM (Figura. 18 A,B,C).

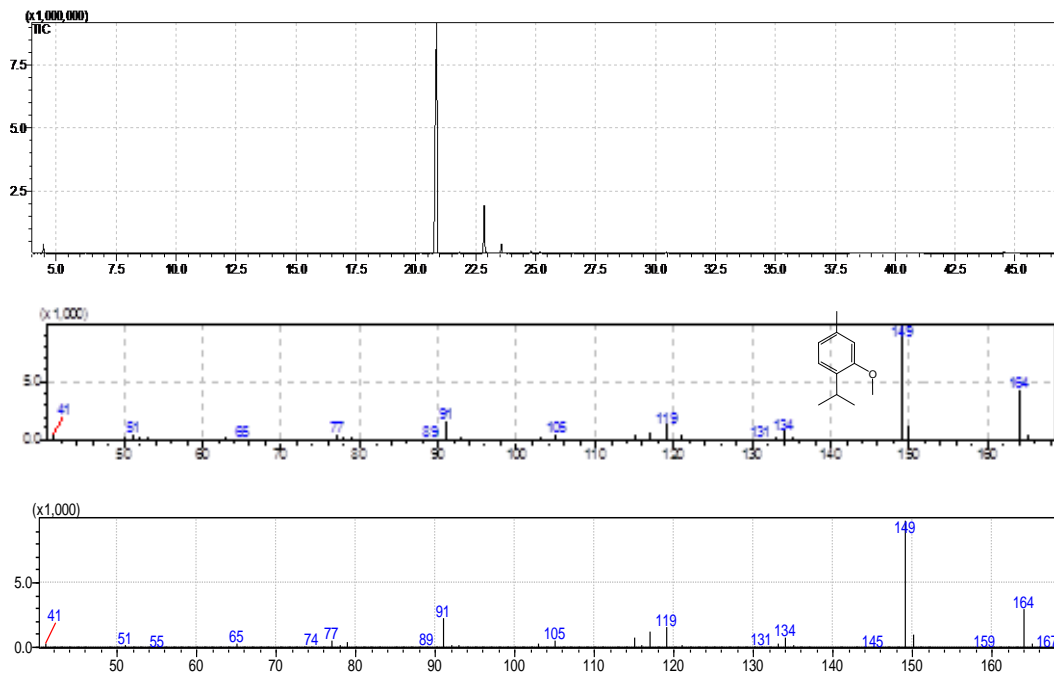


Figura 19. Perfil cromatográfico do produto sintético Timol metil éter (A). Espectro de massas do produto sintetizado (B). Comparação com o espectro de massa da biblioteca do aparelho CG-EM (C).

Tabela 8. Comparação entre componentes dos óleos de *C. clematidea*

Nu m.	IK ^b	IK ^c	Componente ^a	Cc raiz	Cc caule	Cc flor	Cc folha	Identif i.
				%	%	%	%	
1	1000	999	Álcool de Yomogi	-	-	-	2,45	CG- EM
2	1021	1026	o-Cimeno	0,62	-	5,76	-	CG- EM
3	1022	1017	α -terpineno	-	-	-	5,12	CG- EM
4	1229		2-isopropil-4- metilanol	24,29	22,85	2,15	2,64	CG- EM
5	1237	1235	Timol metil éter	42,79	24,15	73,74	-	CG- EM, co
6	1245	1245	Carvacrol metil éter	9,16	4,89	-	-	CG- EM
7	1274		Caleol	-	2,11	5,22	70,41	CG- EM, co
8	1284	1290	Timol	3,06	4,92	-	-	CG- EM
9	1320	1352	Timol acetato	0,71	-	5,13	-	CG- EM
10	1478	-	NI	1,76	2,34	4,04	-	CG- EM
11	1480		6-metil-ionona	14,85	-	1,69	-	CG- EM
12	1488	1481	α -Curcumeno	-	1,97	-	-	CG- EM
13	1504	1485	Germagreno D	-	12,73	-	6,55	CG- EM
14	1515	1510	α -Gurjuneno	-	14,05	-	11,04	CG- EM
15	1570	1578	Espatulenol	-	-	-	1,67	CG- EM
16	1575	1573	Dehidro- apofarnesol	2,66	5,24	2,17	-	CG- EM
17	1606	-	NI	-	1,51	-	-	CG- EM
18	1735	-	NI	-	2,94	-	-	CG- EM
Total				100	99,9	99,7	99,9	99,88

^a Componentes listados em ordem de eluição na coluna DB5; ^b Índice de Kovats na coluna DB5; ^c Índice de Kovats da literatura; NI: não identificado; Co: coinjeção com padrões autênticos. Cc raiz: óleo das cascas das raízes, Cc caule: óleo dos caules, Cc flor: óleo das flores, Cc folha: óleo das folhas de *C. clematidea*.

O óleo essencial das folhas é composto principalmente pelo componente Caleol (70 %), enquanto que este componente é inexpressivo nos demais óleos. Observa-se que nas flores, o componente principal é o timol metil éter, inexistente nas folhas. Portanto, deve haver alguma relação biossintética entre os dois componentes, isto é, o componente caleol poderia ser o precursor do timol metil éter, já que a floração é um estágio mais avançado da planta. Os óleos essenciais de caules e cascas das raízes se assemelham em composição com o óleo das flores. Nestes dois óleos, componentes aromáticos como: 2-isopropil-4-metilanisol, timol metil éter e carvacrol metil éter são os principais componentes. O óleo da raiz ainda apresenta o componente 6-metil-ionona em uma concentração razoável (14,86%), encontrado apenas nas flores em baixa concentração (**Tabela 8**).

Além disso, pode ser observado na **Tabela 8**, a comparação entre as quatro amostras de óleos de *C. clematidea*, o único componente comum em todas as partes da planta é o 2-isopropil-4-metilanisol (**Figura 20**). Os resultados apresentados a respeito das amostras de óleo de flores e folhas corroboram com o trabalho de Flach et al, 2002.

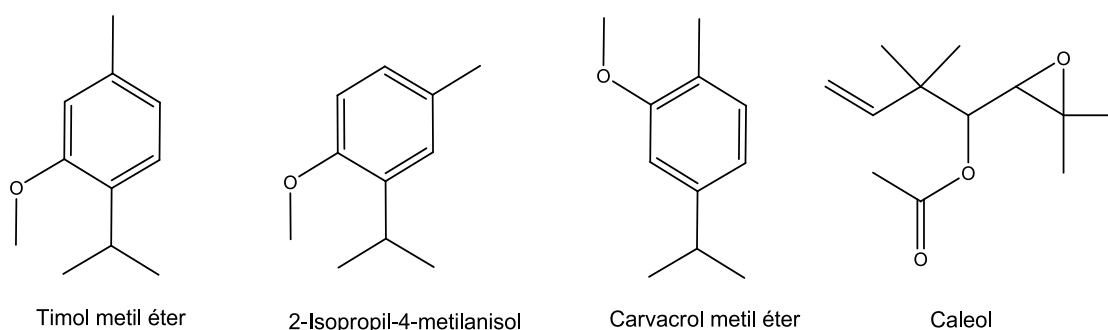


Figura 20. Principais constituintes de *C. clematidea*

5.1.4 Determinação das atividades biológicas *in vitro* dos óleos essenciais de *Calea clematidea*:

5.1.4.1. Teste de Atividade Antioxidante pelo Método do radical livre DPPH

As amostras selecionadas para este teste foram: óleo volátil das folhas, flores, caules e cascas de raízes de *C. clematidea*.

Após análise do teste antioxidante de todos os óleos, obteve-se a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) do óleo das folhas, óleo das flores, óleo dos caules e óleo das raízes nas concentrações de 1, 246; 1,343; 0,570 e 0,542 mg/mL, respectivamente. Este resultado, comparado com o controle Butil-Hidroxi Tolueno (BHT), cujo IC₅₀ é 0,0312 mg/mL, pode ser considerado inexpressivo.

Conforme pode ser observado na **Figura 21**, tanto óleo das raízes quanto dos caules, apresentaram atividades moderadas nas mais altas concentrações quando comparadas ao controle BHT, porém são mais ativas se comparadas com as atividades dos óleos das folhas e das flores. Esta atividade relativamente mais expressiva encontrada nos primeiros óleos pode ser atribuída à presença, embora em pequenas quantidades (3,06 e 4,92%) de timol, que segundo a literatura, tem atividade antioxidante (AESCHBACH, 1994).

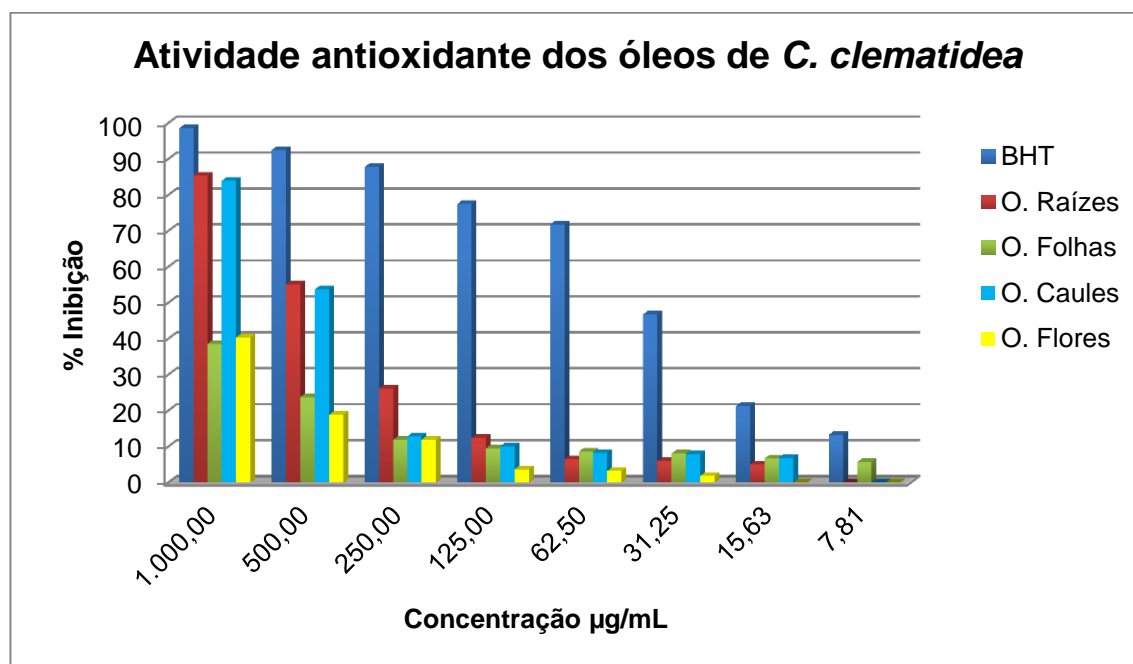


Figura 21. Atividade antioxidante de amostras de *C. clematidea*. BHT: Butil hidroxi Tolueno (padrão), O Raízes: Óleo das cascas das raízes, O. Folhas: Óleo das folhas, O. Caules: Óleo dos caules, O. Flores: Óleo das flores.

5.1.4.2. Atividade antimicrobiana

Para a determinação da atividade antimicrobiana dos óleos, utilizou-se do método de Microdiluição em caldo (CIM). Desta maneira determinou-se a

concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM) para os óleos, conforme **Tabela 9**.

Tabela 9. Resultados de CIM, CBM e CFM para os óleos voláteis *C. clematidea*

Características	Microorganismos ^a	Cc caule		Cc raiz		Padrão ^c
		CIM ^b	CBM ^b	CIM ^b	CBM ^b	CIM ^b
Gram-positivos	<i>Staphylococcus aureus</i>	10	>10	5	>10	3,12 x10 ⁻³
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,5	>10	10	>10	3,12 x10 ⁻³
	<i>Bacillus subtilis</i>	5	>10	>10	-	3,12 x10 ⁻³
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1,25	10	5	>10	3,12 x10 ⁻³
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	10	>10	>10	-	3,12 x10 ⁻³
Gram-negativos	<i>Escherichia coli</i>	5	>10	5	>10	3,12 x10 ⁻³
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>10	-	10	>10	3,12 x10 ⁻³
	<i>Shigella sonnei</i>	10	>10	2,5	10	3,12 x10 ⁻³
Características	Microorganismos	CIM^b	CFM^b	CIM^b	CFM^b	CIM^b
Fungos	<i>Candida albicans</i>	10	10	10	>10	6,25 x10 ⁻³
	<i>Candida tropicalis</i>	10	>10	10	10	6,25 x10 ⁻³
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	2,5	10	5	10	10,3 x10 ⁻³
	<i>Sacharomyces cerivisae</i>	10	10	>10	-	5,15 x10 ⁻³

^a ATCC (American Type Culture Collection); ^b em mg.mL⁻¹; ^c Cloranfenicol para bactérias e nistatina para levedura;

Aligiannis et al. (2001) propuseram uma classificação para materiais de plantas, baseado nos resultados de CIM (Concentração Inibitória Mínima), onde descrevem Fortes inibidores: CIM inferiores a $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$; inibidores moderados: CIM entre $0,6$ e $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$; e inibidores fracos: CIM acima de $1,6 \text{ mg mL}^{-1}$. Porém, Duarte et al. (2005) caracterizaram o extrato como potencialmente antimicrobiano aquele onde a inibição em concentrações vegetais foi de até 2 mg mL^{-1} .

Os resultados demonstraram a alta concentração dos óleos necessária para a inibição do crescimento microbiano (**Tabela 9**), evidenciando que os mesmos não apresentam fortes atividades antimicrobianas. De uma maneira geral o óleo do caule foi mais efetivo na inibição do crescimento bacteriano e fúngico.

Destaque é dado a atividade do óleo do caule frente a bactéria *Streptococcus pyogenes* que apresentou uma atividade bacteriostática moderada de $1,25 \text{ mg/mL}$. O que pode explicar esta maior atividade deste óleo comparado ao das raízes, é a presença em maiores concentrações dos componentes Germacreno D (12,73%) que segundo o trabalho de Jovanovic et al (2005) possui significativa atividade antimicrobiana.

5.2 Estudo dos óleos essenciais de *Acanthospermum australe*

Família: Asteraceae

Esta espécie foi selecionada para este trabalho, por ser considerada uma planta medicinal, comum no RS e considerada muitas vezes como praga.

Como já explicado anteriormente foram coletadas amostras de várias partes do Rio Grando do Sul, como esta demonstrado na **Tabela 10** a seguir:

Tabela 10. Siglas das amostras de *A. australe*

Local de Coleta	Parte vegetal coletada	Sigla
Frederico Westphalen	raízes	AaFWra
	partes aéreas	Aa FW PA
Santa Maria	raízes	AaSMra
	partes aéreas	AaSMPA
Três de Maio	partes aéreas	AaTMPA
	raízes	AaTM ra
Lajeado-RS	raízes	AaLajra

5.2.1 Propriedades físicas e rendimentos dos óleos voláteis de *Acanthospermum australe*

Os dados físicos obtidos para *A. australe* estão descritos na **Tabela 11**. Pode-se observar que os rendimentos das três amostras de raízes apresentam-se semelhantes entre si, mas significativamente superiores aos rendimentos encontrados para as partes aéreas. Todas as amostras apresentaram coloração verde clara.

Tabela 11. Dados físicos dos óleos essenciais de *Acanthospermum australe*

Amostra	Rendimento	d	α [0,05; CH ₂ Cl ₂]	η
Aa FW ra	1,07%	0,9122	-47,9	1,4680
Aa FW PA	0,20%	0,9233	-22,8	1,4906
Aa TM ra	0,95%	0,9000	-34,3	1,5008
Aa TM PA	0,15%	0,7600	-35,8	1,4456
Aa SM ra	1,04%	0,9050	-54,7	1,4567
Aa SM PA	0,18%	0,9100	-49,9	1,4998
Aa Laj ra	ND	0,9189	-40,0	1,4599

R – rendimento em porcentagem; d - densidade em g.mL⁻¹, α - rotação ótica e η - índice de refração, ND-Não determinado

5.2.2 Determinação dos constituintes do óleo das partes aéreas e raízes de *A. australe*

Os óleos voláteis das partes aéreas e raízes de *A. australe* foram submetidos à análise cromatográfica, sendo possível a identificação de parte dos constituintes químicos. As **Figuras 22 a 26** ilustram o perfil cromatográfico das amostras, enquanto as respectivas constituições químicas encontram-se na **Tabela 12**. A numeração dos constituintes apresentada nos cromatogramas corresponde à numeração dos mesmos na **Tabela 12**.

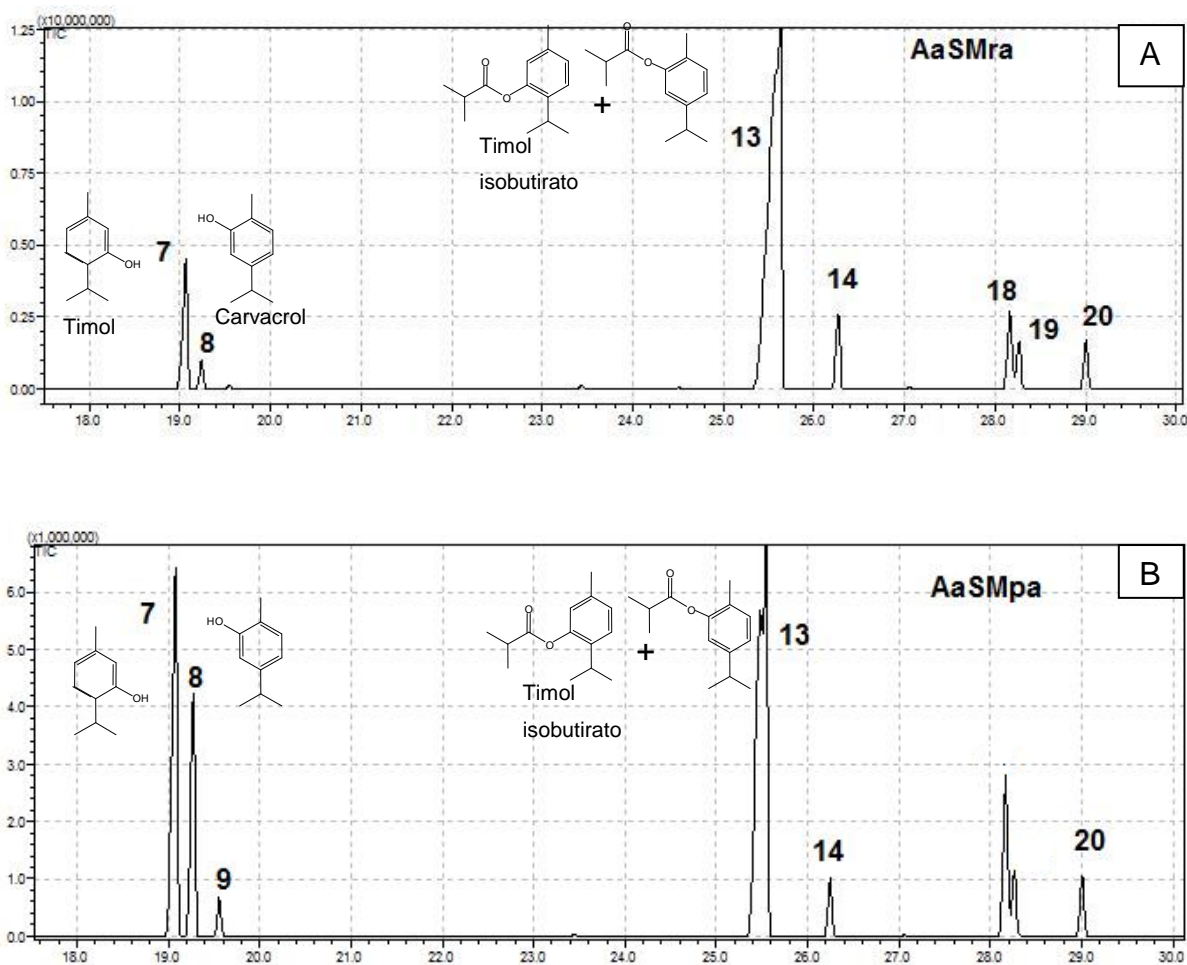


Figura 22. Perfil cromatográfico do óleo das raízes de *A. australe* de Santa Maria (A). Perfil cromatográfico do óleo das partes aéreas de *A. australe* de Santa Maria (B). Utilizando coluna 5MS, CCSF de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50 °C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4 °C min⁻¹.

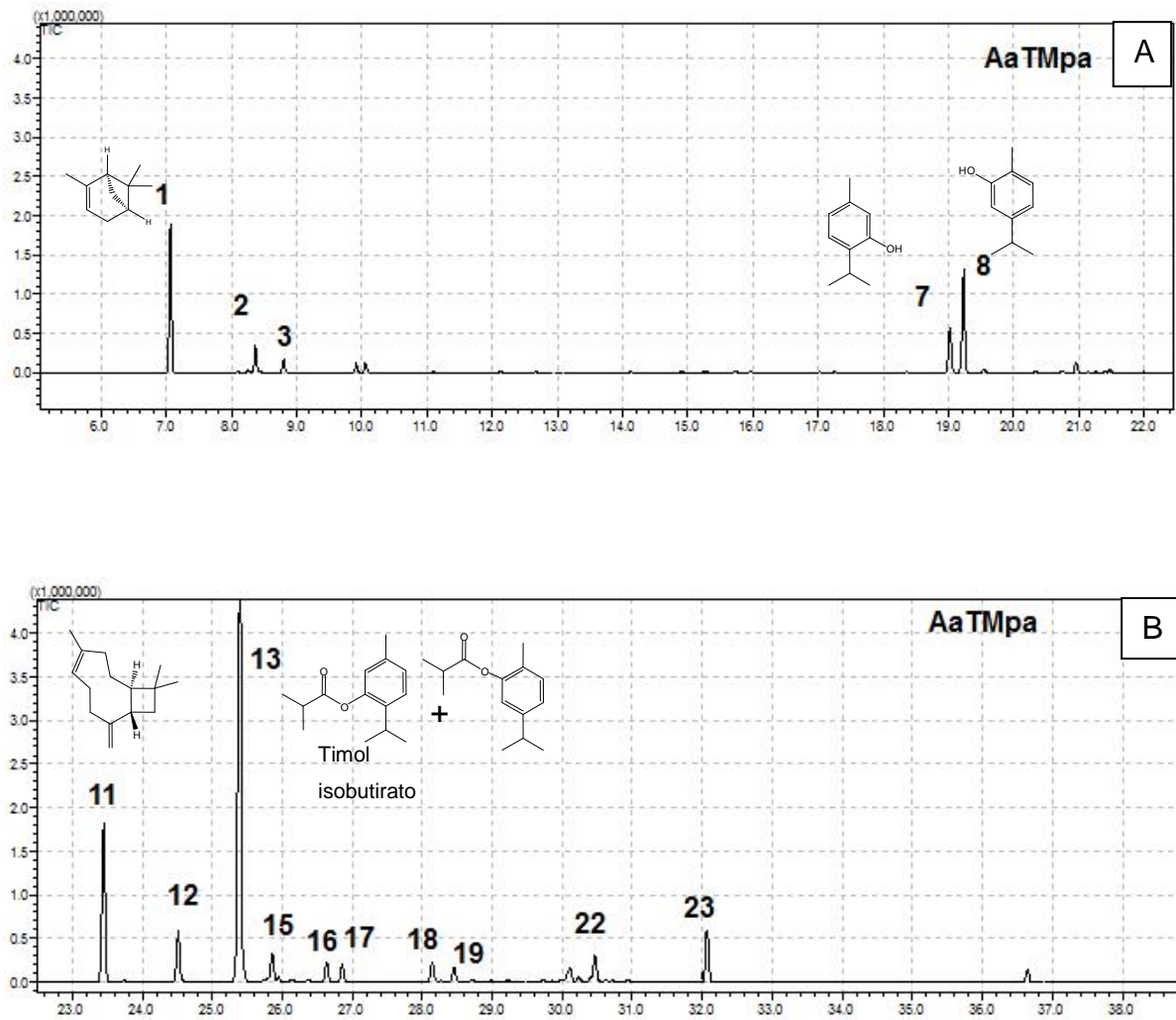


Figura 23. Perfil cromatográfico do óleo das partes aéreas de *A. australe* da amostra de Três de Maio (A). Continuação do perfil cromatográfico do óleo das partes aéreas de *A. australe* da amostra de Três de Maio (B). Utilizando coluna 5MS, CCSF de 25 m. Programa de análise: = 50 °C, Tfinal= 250 °C, rampa de 4 °C min⁻¹.

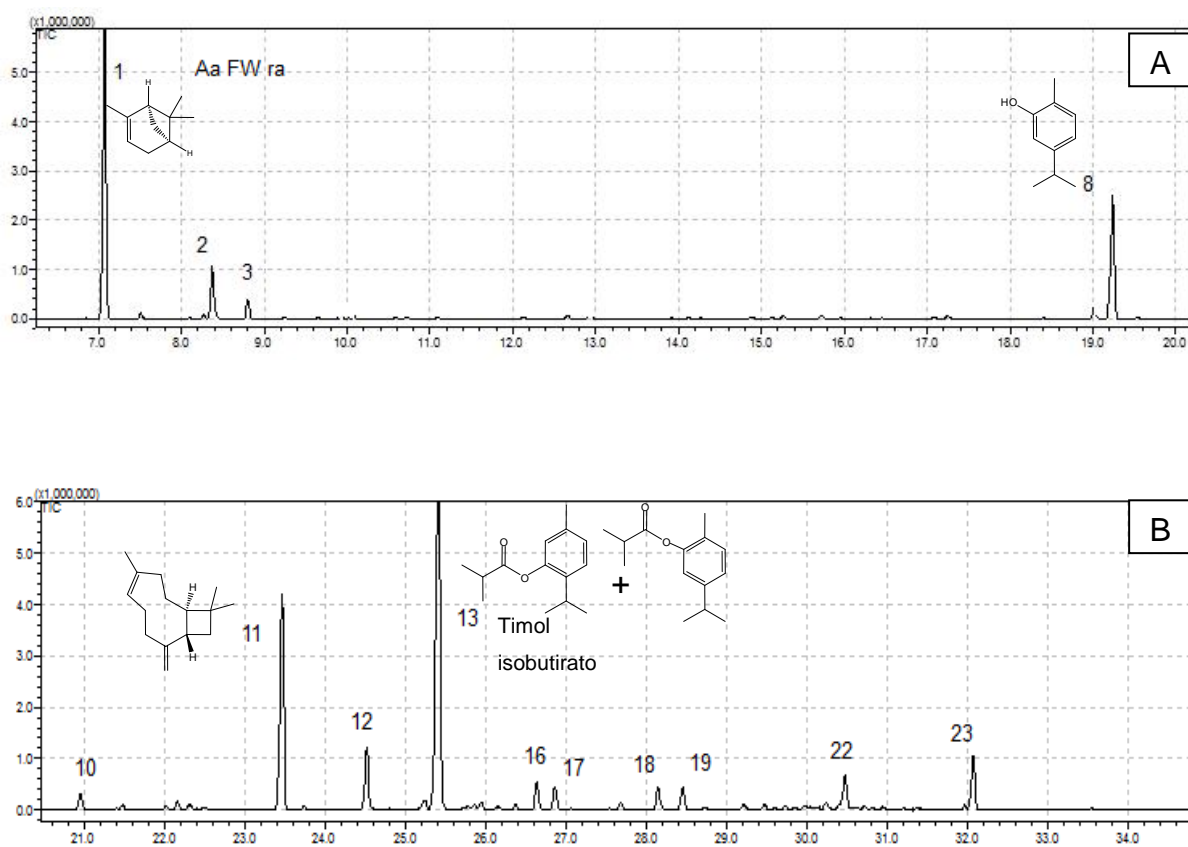


Figura 24. Perfil cromatográfico do óleo das raízes de *A. australe* da amostra de Frederico Westphalen (A) Continuação do perfil cromatográfico do óleo das raízes de *A. australe* da amostra de Frederico Westphalen (B). Utilizando coluna 5MS, CCSF de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50 °C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4 °C min⁻¹.

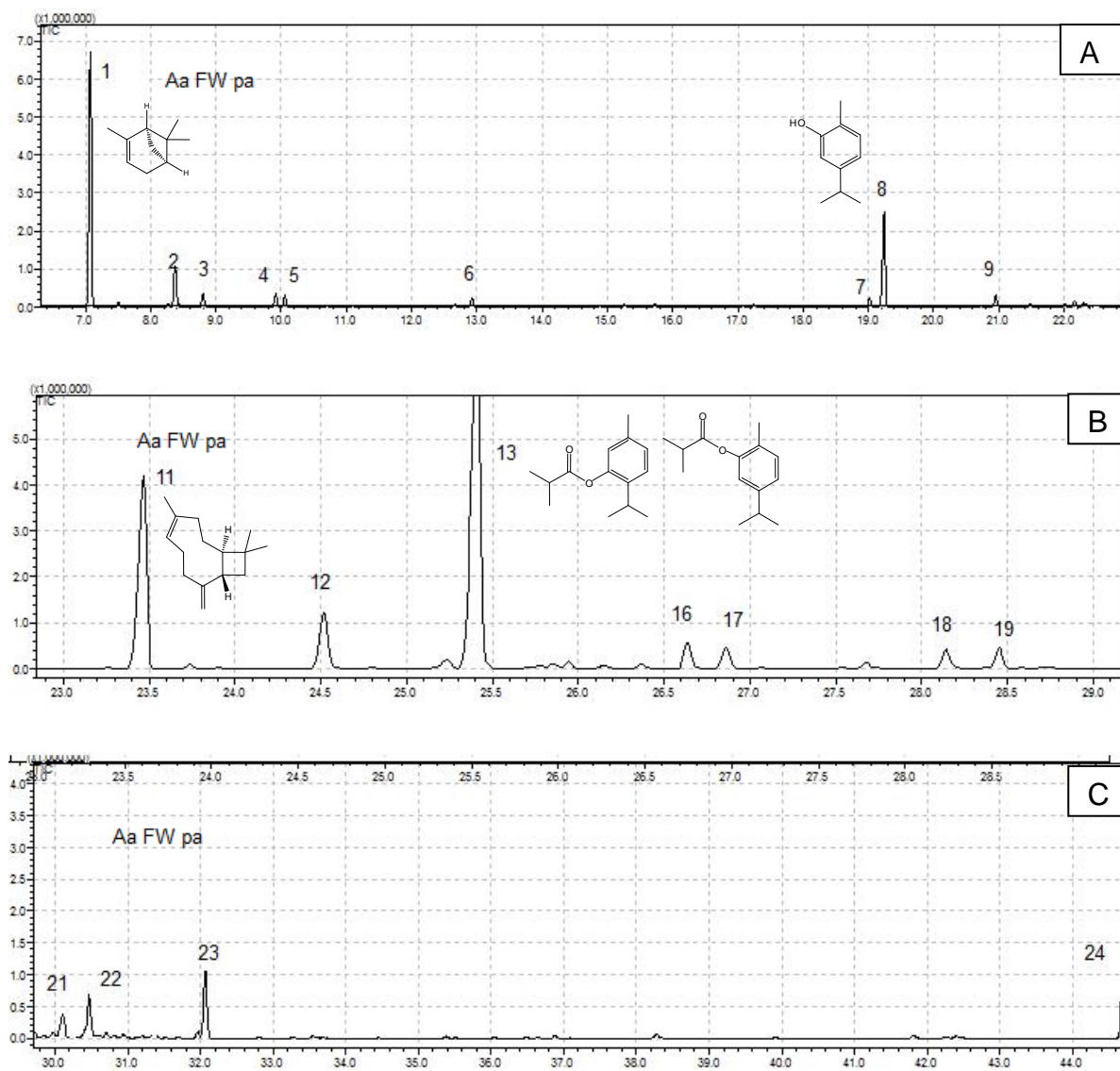


Figura 25. Perfil cromatográfico do óleo das partes aéreas de *A. australe* da amostra de Frederico Westphalen (A). Continuação do perfil cromatográfico do óleo das partes aéreas de *A. australe* da amostra de Frederico Westphalen (B). Continuação do perfil cromatográfico do óleo das partes aéreas de *A. australe* da amostra de Frederico Westphalen (C) Utilizando coluna 5MS, CCSF de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50 °C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4 °C min⁻¹.

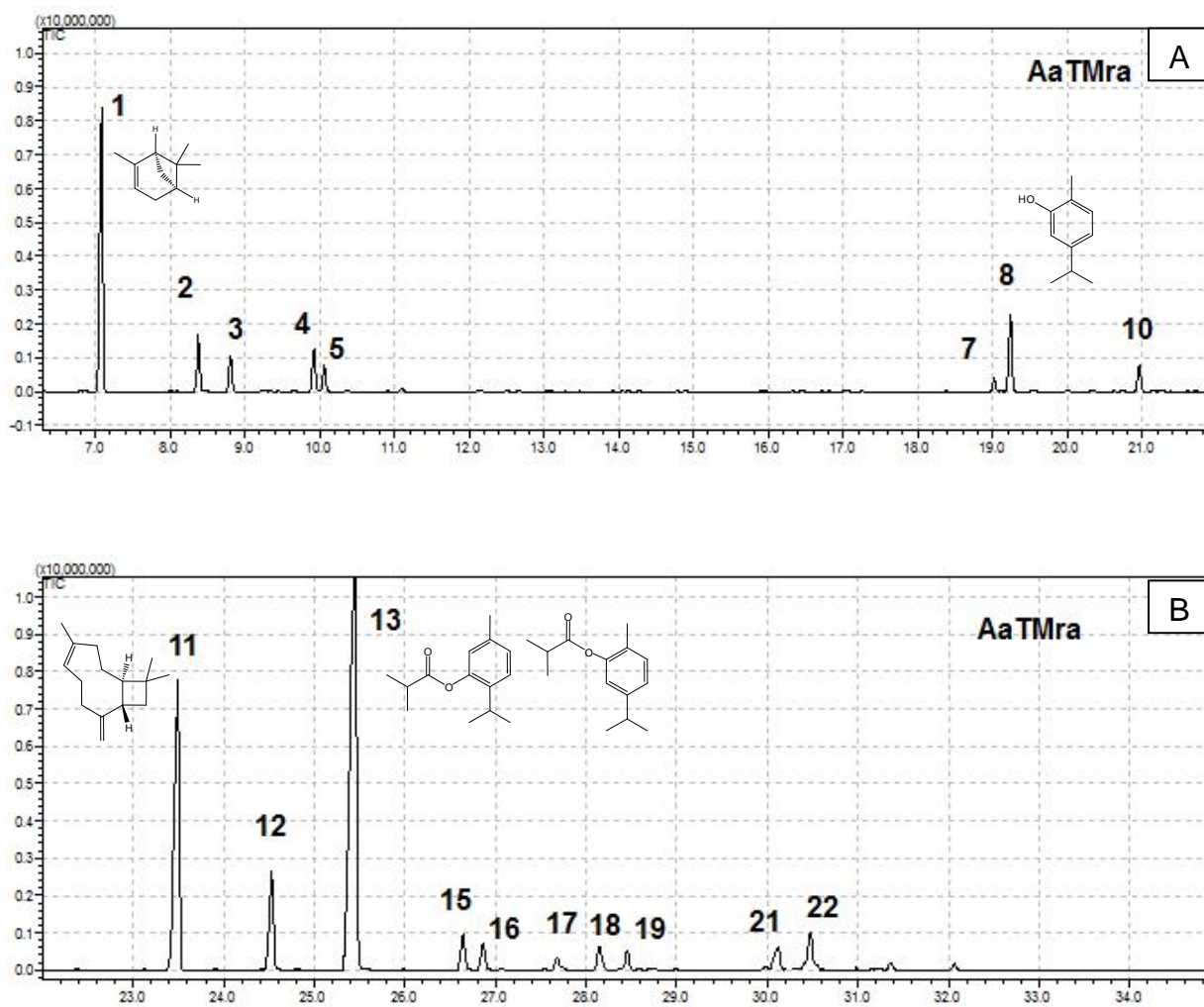


Figura 26. Perfil cromatográfico do óleo das raízes de *A. australe* da amostra de Três de Maio (A). Continuação do perfil cromatográfico do óleo das raízes de *A. australe* da amostra de Três de Maio (B). Utilizando coluna 5MS , CCSF de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}=50 °C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4 °C min⁻¹.

Tabela 12. Comparação entre componentes dos óleos de *A. australe*

Nº	Amostras		Componente ^a	TM pa	TM ra	SM ra	SM pa	FW pa	FW ra	Laj ra	Identific.
	IK ^b	IK ^c		%	%	%	%	%	%	%	
1	940	939	α -pineno	10,74	14,45	-	-	18,11	19,28	-	CG-EM
2	985	979	β -pineno	1,98	2,67	-	-	2,70	3,00	-	CG-EM
3	993	991	β -mirceno	0,85	1,59	-	-	0,94	1,00	-	CG-EM
4	1019	1026	o-Cimeno	-	2,16	0,53	-	0,86	-	-	CG-EM
5	1123	-	NI	-	1,22	-	-	0,82	-	-	CG-EM
6	1206	1210	Acetato de octil-3	-	-	-	-	0,66	-	-	CG-EM
7	1287	1290	Timol	3,83	0,66	9,18	22,72	0,73	-	4,37	CG-EM
8	1297	1299	Carvacrol	9,50	4,57	1,28	12,42	8,24	8,70	0,81	CG-EM
9	1299	-	NI	-	-	-	1,41	-	-	-	CG-EM
10	1333	-	NI	-	1,40	-	-	0,85	0,96	-	CG-EM
11	1413	1418	β -Cariofileno	13,70	19,96	-	-	14,96	15,93	-	CG-EM
12	1447	1466	Cariofileno-9-epi (E)	4,13	5,66	-	-	4,15	4,34	-	CG-EM
13	1475	-	Timol isobutirato e Carvacrol isobutirato	39,32	36,31	73,13	47,14	29,31	31,12	84,89	CG-EM, RMN
14	1490	-	NI	-	-	4,82	2,35	-	-	3,77	CG-EM
15	1510	1509	Germacreno A	2,02	-	-	-	-	-	-	CG-EM
16	1519	1514	γ -cadineno	1,54	1,80	-	-	1,74	1,86	-	CG-EM
17	1529	1523	δ -cadineno	1,30	1,30	-	8,68	1,51	1,51	-	CG-EM
18	1550	-	NI	1,58	1,44	5,40	2,46	1,44	1,51	2,68	CG-EM
19	1575	1583	Óxido de Cariofileno	0,98	0,90	2,76	-	1,37	1,50	1,92	CG-EM
20	1603	-	NI	-	-	2,90	2,82	-	-	1,56	CG-EM
21	1634	-	Tau-muurolol	-	1,55	-	-	1,58	-	-	CG-EM
22	1647	1654	α -cadinol	1,75	1,43	-	-	2,12	1,96	-	CG-EM
23	1700	-	NI	4,37	-	-	-	3,47	3,70	-	CG-EM
24	2427	-	NI	0,92	0,93	-	-	3,08	3,10	-	CG-EM
Total				98,51	100,00	100,00	100,00	98,64	99,47	100	

^a Componentes listados em ordem de eluição na coluna DB5; ^b Índice de Kovats na coluna DB5; ^c Índice de Kovats da literatura; NI: não identificado; RMN: Isolado e a Ressonância Magnética Nuclear. TM ra: amostra das raízes de Três de Maio, TM pa: amostra das partes aéreas de Três de Maio, SM ra: amostra das raízes de Santa Maria, SM pa: amostra das partes aéreas de Santa Maria, FW ra: amostra das raízes de Frederico W., FW pa: amostra das partes aéreas de Frederico W., Laj ra: amostra das raízes de Lageado.

De acordo com a **Tabela 12**, a análise cromatográfica indicou que as amostras de óleo de Santa Maria e Lajeado possuem perfil cromatográfico semelhante. Do mesmo modo, as amostras de Frederico e Três de Maio apresentam mais componentes comuns entre si. Estes achados podem ser explicados pela maior semelhança nas condições climáticas e de solo entre as duas cidades do norte e as duas cidades localizadas mais ao centro do Rio Grande do Sul. Importante salientar que todos os óleos apresentaram o mesmo componente majoritário, que foi mais concentrado nas amostras de S. Maria e Lageado.

O pico majoritário das sete amostras não pôde ser identificado por CG-EM, assim como Becker, 2008 também constatou em seu trabalho, onde analisou as amostras desta mesma espécie coletadas na cidade de Lajeado. Desta maneira o pico majoritário foi isolado e identificado por RMN, trata-se de uma mistura de Timol isobutirato e Carvacrol isobutirato (**Figura 38**), inéditos nesta espécie.

Em um estudo anterior, Moraes et al (1997), analisou o óleo das folhas de *A. australe* através de CG/EM e RMN. Os componentes encontrados no óleo foram: β -cariofileno (16,0%), β -elemeno (14,4%), γ -cadineno (13,0%), germacreno A (10,1%) e δ -cadineno (5,5%). Como se pode constatar todos estes componentes estão presentes nos óleos aqui analisados, com exceção do β -elemeno (**Tabela 12**).

Analisando-se os óleos das partes aéreas e raízes de cada localidade, verificaram-se diferenças acentuadas na composição dos óleos (**Tabela 12**). Por exemplo, o óleo de Santa Maria não apresentou os pinenos, β -cariofileno e cariofileno-9-*epi* (E) comuns nos demais óleos. Por outro lado, o óleo das partes aéreas de S. Maria apresentou uma concentração grande de timol (22%), comparado aos demais óleos. Comum em todos os óleos foi o componente numerado nos cromatogramas como **13**.

5.2.2.1 Análise do isolamento do componente majoritário dos óleos das raízes de *A. australe*

Com a finalidade de se isolar o componente principal dos óleos, selecionou-se o óleo **AaSMra** para o fracionamento. Através de CC, foram obtidas várias frações, sendo a segunda rica no componente **13 (AaFr2)**. A **Figura 27** mostra o cromatograma o componente **13**, embora concentrado, ainda não era puro.

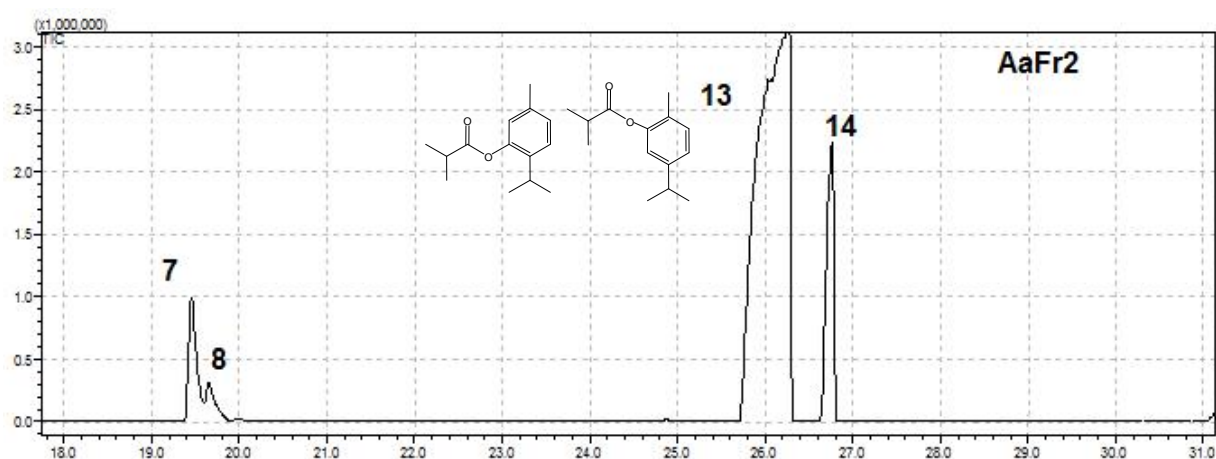


Figura 27. Perfil cromatográfico da fração isolado **AaFr2** das folhas de *A. australe*. A coluna utilizada é a 5MS, CCSF de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50°C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4°C min⁻¹

Como **AaFr2** ainda apresentava-se acompanhada por outros componentes, a mesma foi novamente submetida a uma separação por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP). Obteve-se uma fração purificada (**AA1**), e que segundo análise por CG (**Figura 28**) mostrou-se apta para análise de RMN.

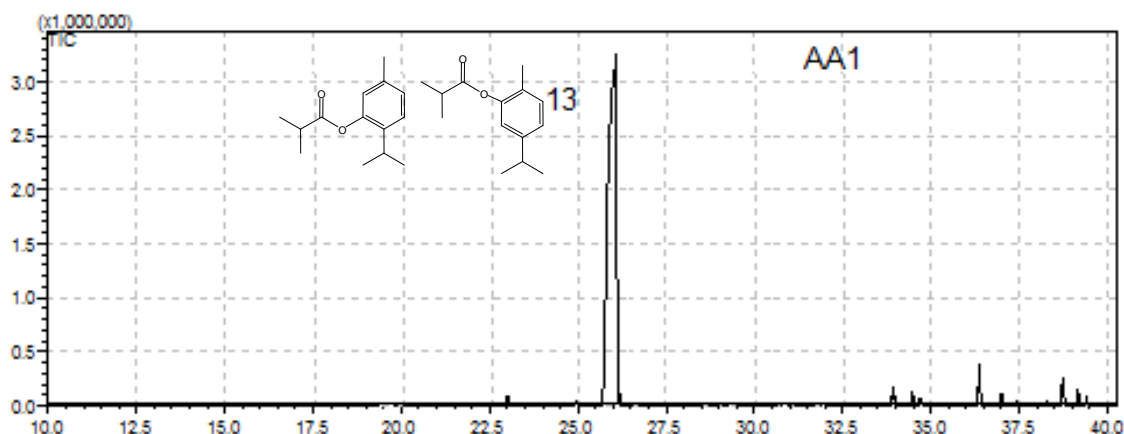


Figura 28. Perfil cromatográfico da mistura de terpenos isolado AA1 das folhas de *A.australe*. A coluna utilizada é a 5MS, CCSF de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50°C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4°C min⁻¹.

5.2.2.1.1 Determinação estrutural de AA1

Inicialmente a amostra foi submetida a CG-EM, onde se observou um íon molecular $[M]^+$ com m/z de 220, (**Figura 29**), sugerindo um composto sesquiterpênico.

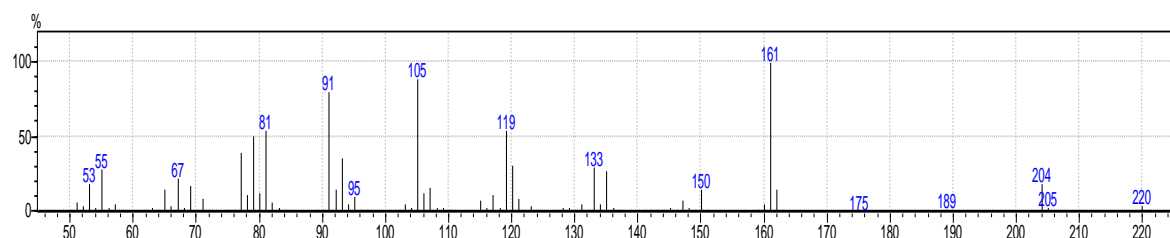


Figura 29. Espectro de massas da mistura majoritária do óleo das folhas de *A. australe*.

O espectro de RMN de hidrogênios (**Figura 30**) mostrou-se muito simplificado para um sesquiterpeno. Entre 1,1 e 1,3 ppm, observou-se metilas: na forma de dupletos, características de um grupo isopropila, na forma de singleto com integração para 3 hidrogênios e outra metila ligada a um sistema aromático, em 2,3 ppm. Próximo a 3 ppm, verificou-se hidrogênios metínicos na forma de multipletos. Os demais hidrogênios estão localizados na região de aromáticos.

A expansão dos espectros (**Figura 31**) mostra claramente a sobreposição de sinais indicando que a amostra é composta por dois componentes Isoméricos, com

características de compostos isoprenóides. O outro espectro de expansão RMN de hidrogênios (**Figura 32**) mostra as duas metilas ligadas ao sistema aromático.

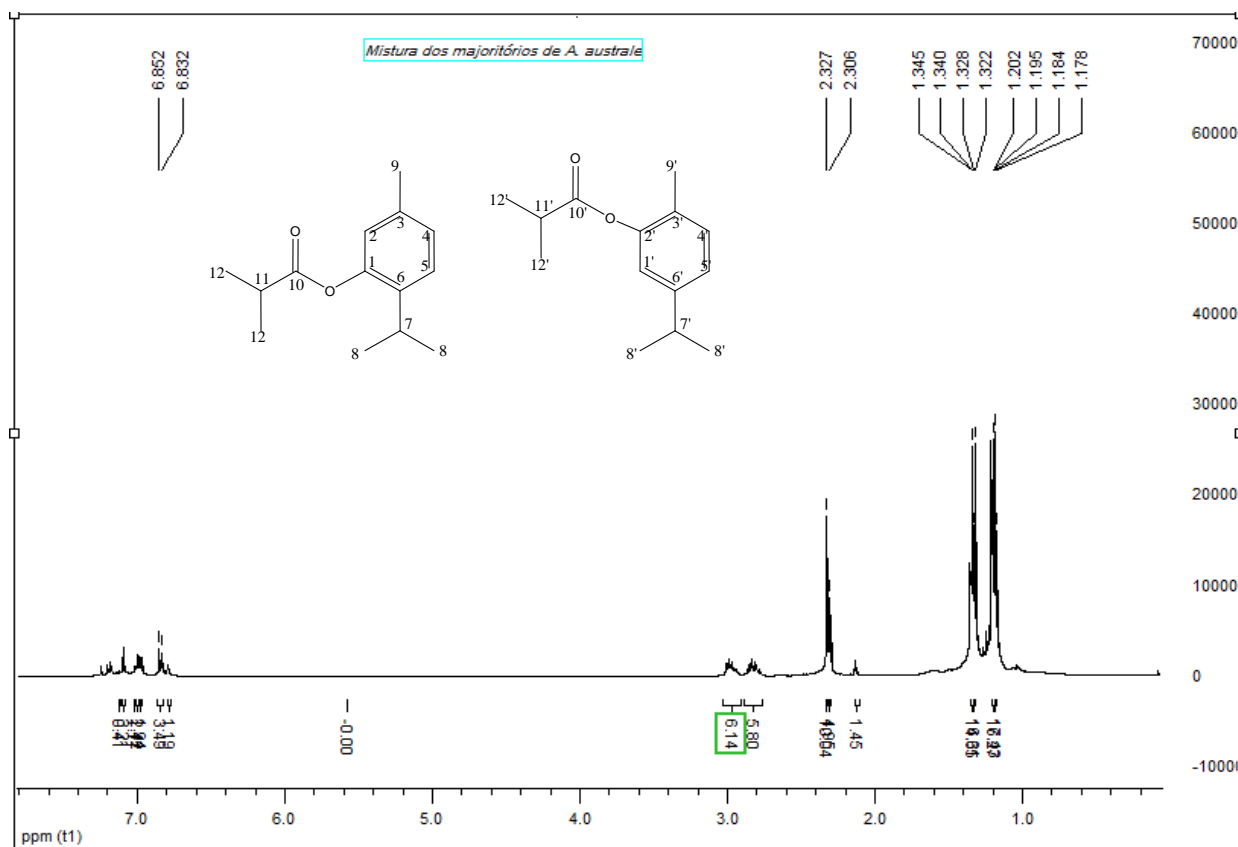


Figura 30. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz em CDCl_3 , da mistura de majoritários de *A. australe*.

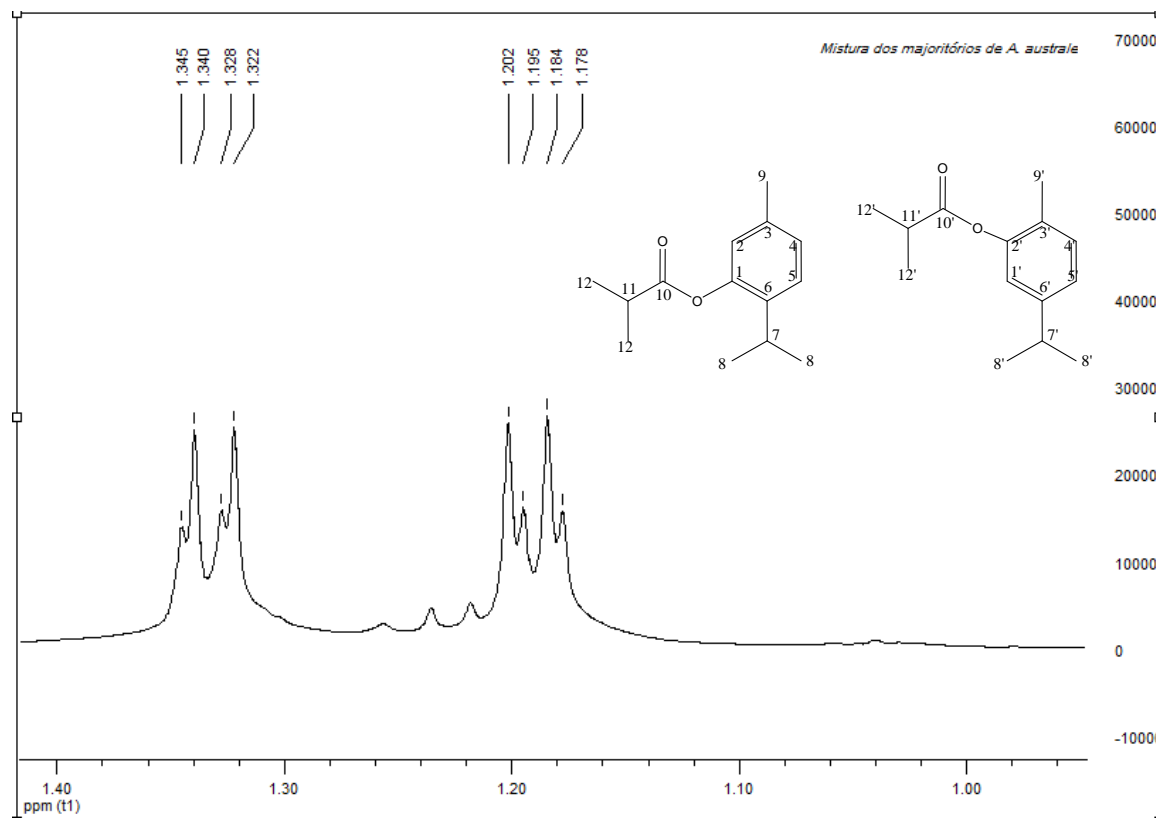


Figura 31. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 400 MHz em CDCl_3 , da mistura de majoritários de *A. australe*

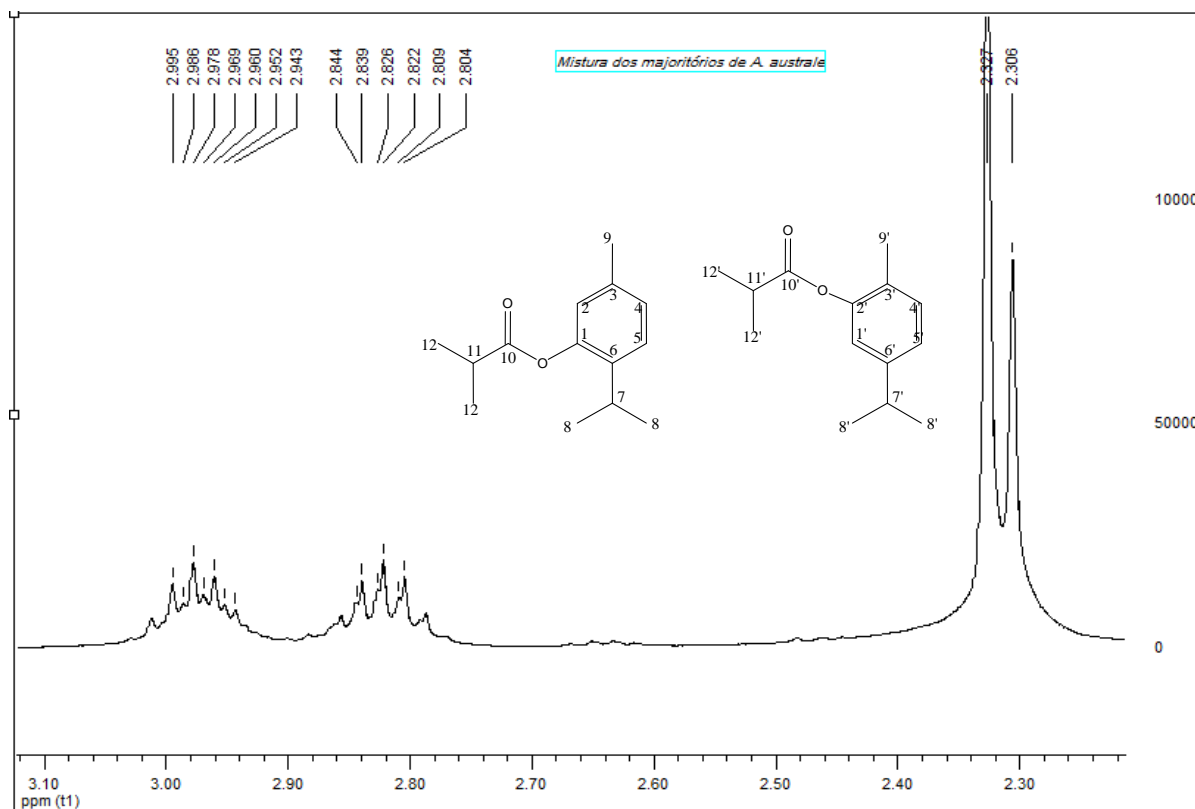


Figura 32. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 400 MHz em CDCl_3 , da mistura de majoritários de *A. australe*.

O espectro de carbono-13 (**Figura 33**) e sua expansão (**Figura 34**), mostram que se trata realmente de uma mistura em uma relação próxima de 2:1, sendo cada esqueleto formado por 6 carbonos aromáticos, sendo 3 hidrogenados, uma carbonila de éster e cinco grupos metilas, sendo um em região de metila ligada a carbono aromático.

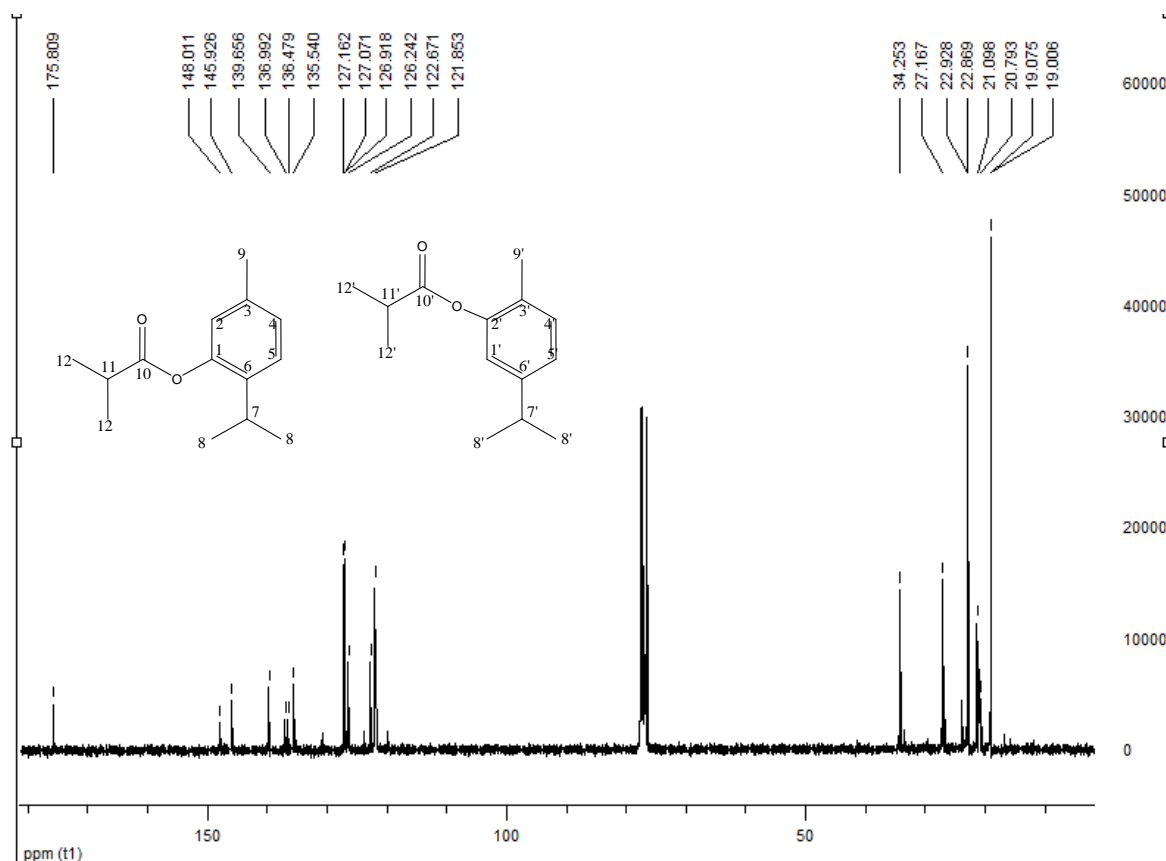


Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C a 400 MHz em CDCl_3 , da mistura de majoritários de *A. Australe*

O espectro DEPT (**Figura 34**) mostra que a estrutura não apresenta grupo metilênico, e que apresenta quatro carbonos desidrogenados. Os espectros COSY (**Figura 35 a 37**) mostram apenas que os hidrogênios metínicos estão em correlação com as metilas, caracterizando o substituinte isopropila. Após a análise destes dados, juntamente com os dados de EM, chegou-se a conclusão que a amostra AA1 trata-se de uma mistura de dois compostos isopropenoides isoméricos, identificados como Timol isobutirato (**1**), e Carvacrol isobutirato (**2**) (**Figura 38**). Para tornar a comparação entre as duas estruturas mais didática a numeração do composto Carvacrol isobutirato não foi iniciada no carbono de maior prioridade, que deveria ser o do grupo isobutirato. Os dados com deslocamentos químicos da mistura AA1 estão relacionados na **Tabela 13**.

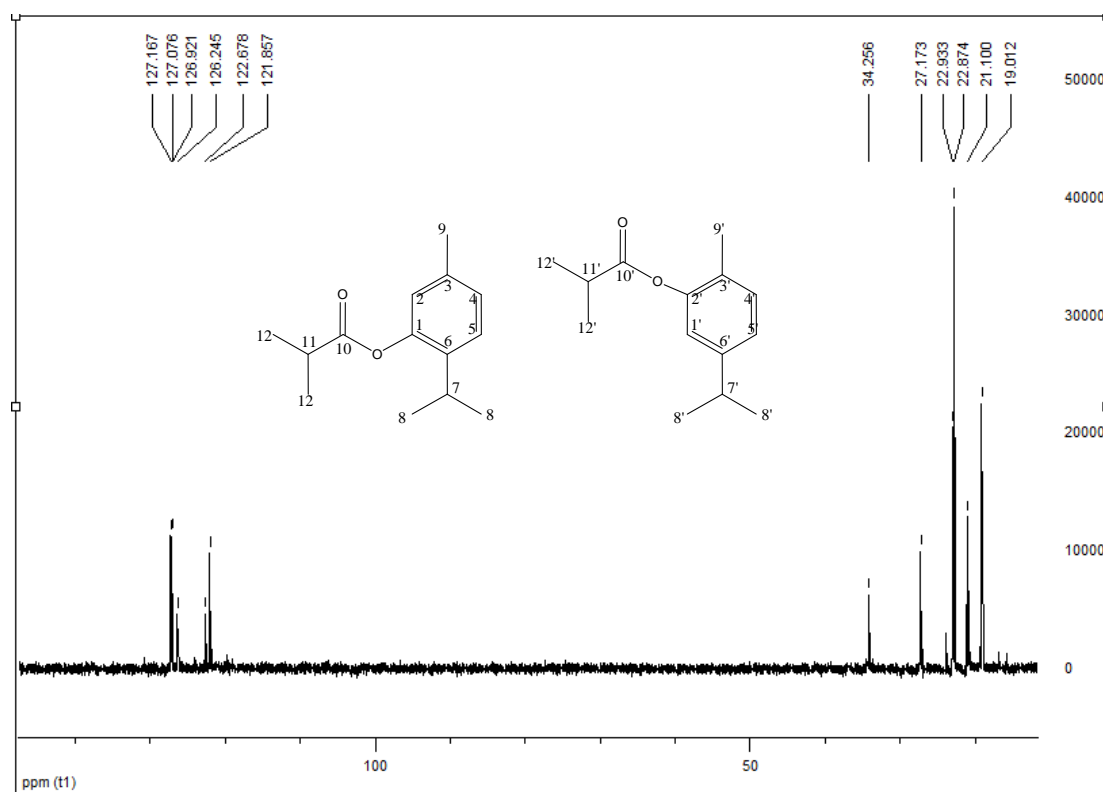


Figura 34. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT-135 em CDCl_3 , da mistura de *A australe*

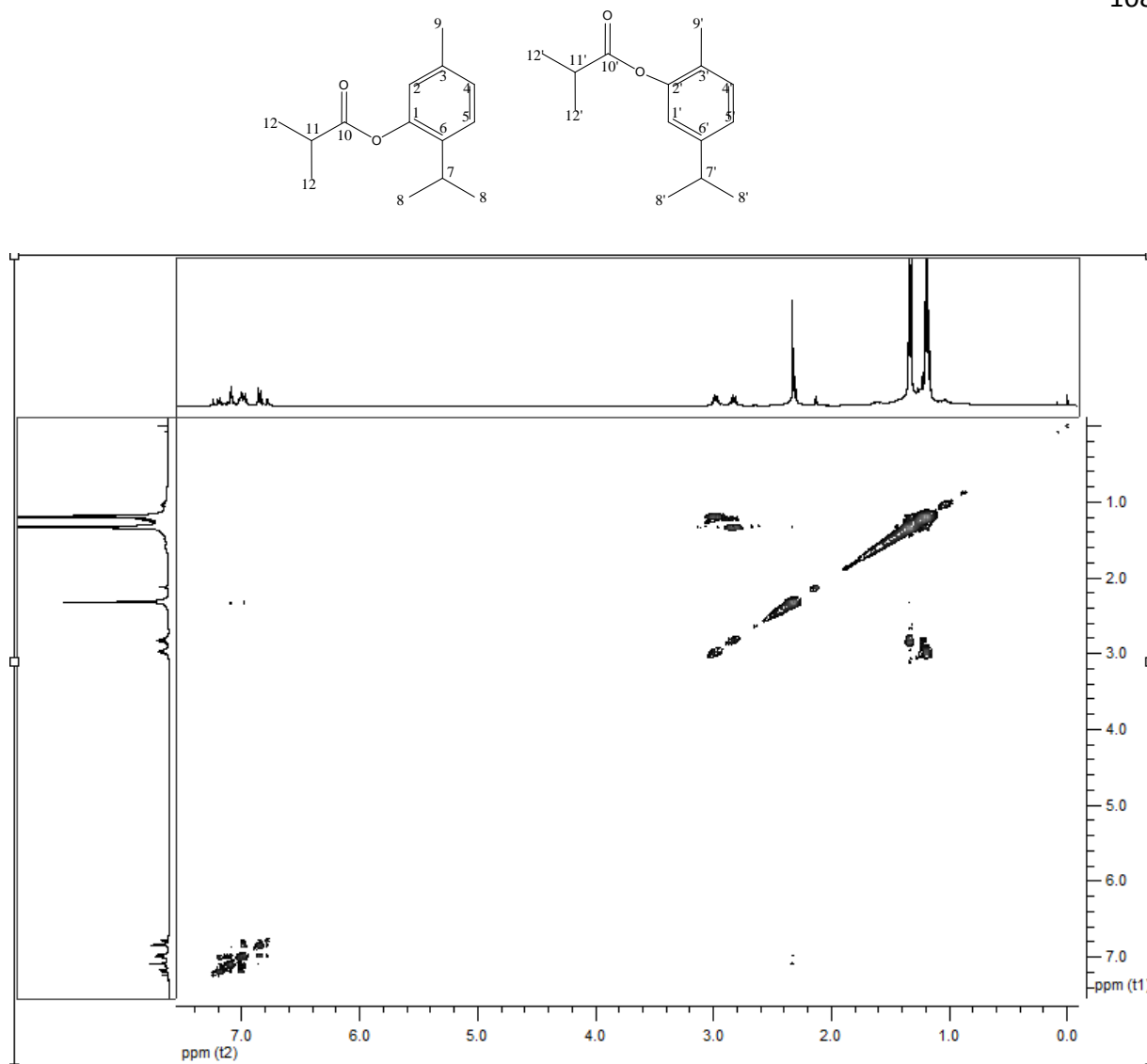


Figura 35. Espectro de COSY da mistura dos majoritários de *A. australe*, em CDCl₃, a 400 MHz.

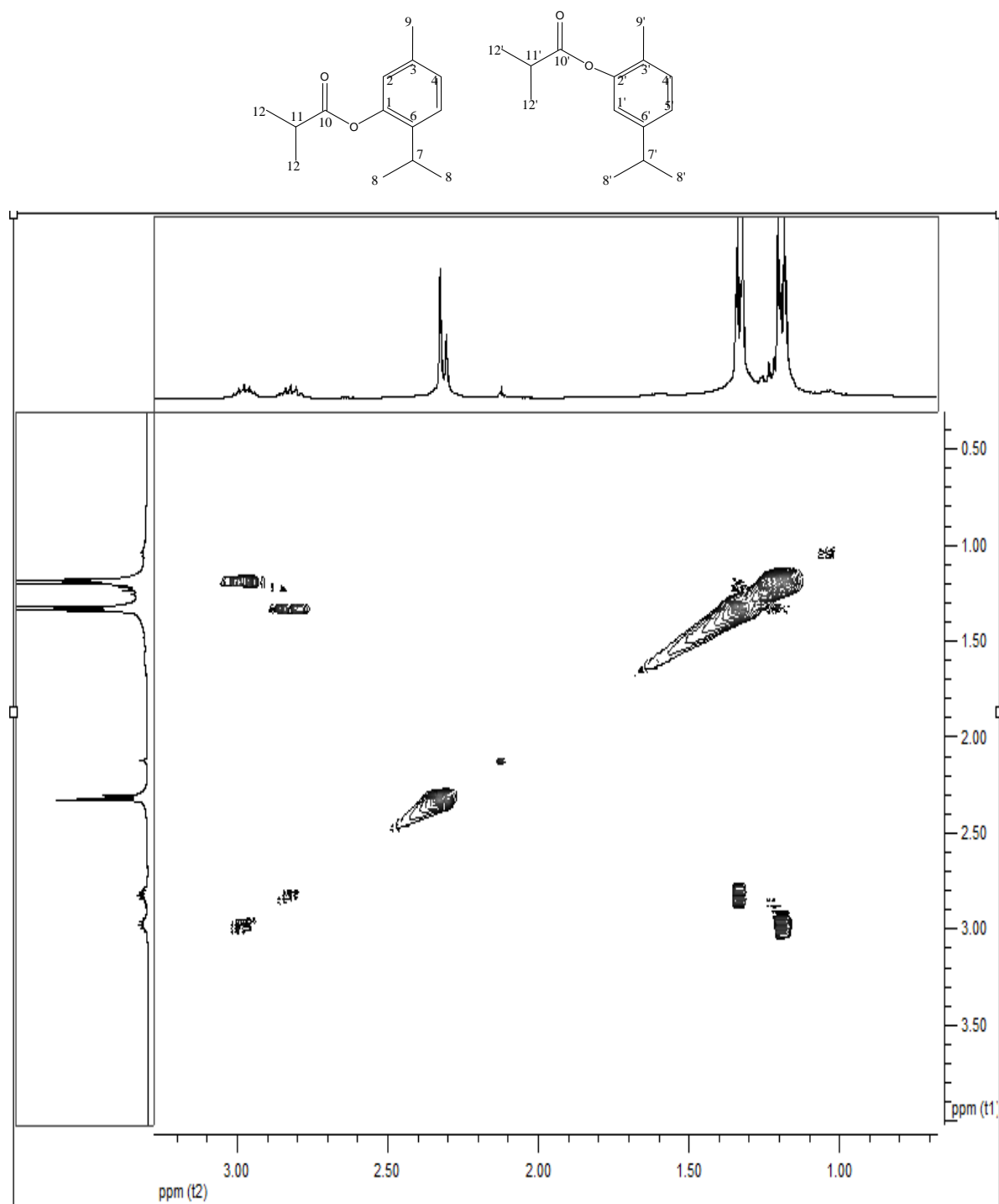


Figura 36. Espectro ampliado de COSY da mistura dos majoritários de *A. australe*, em CDCl_3 , a 400 MHz.

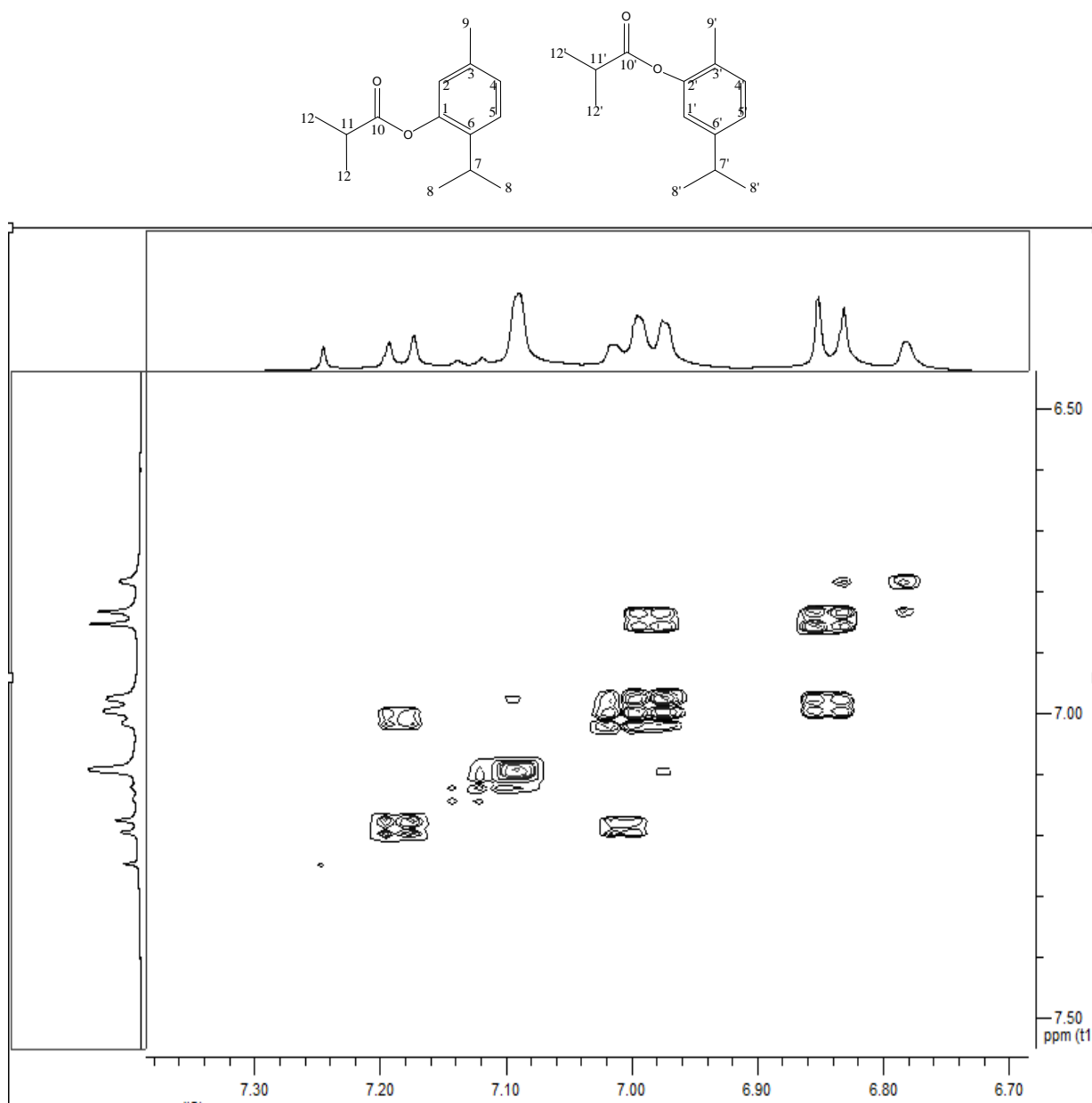


Figura 37. Espectro ampliado de COSY da mistura dos majoritários de *A. australe*, em CDCl_3 , a 400 MHz

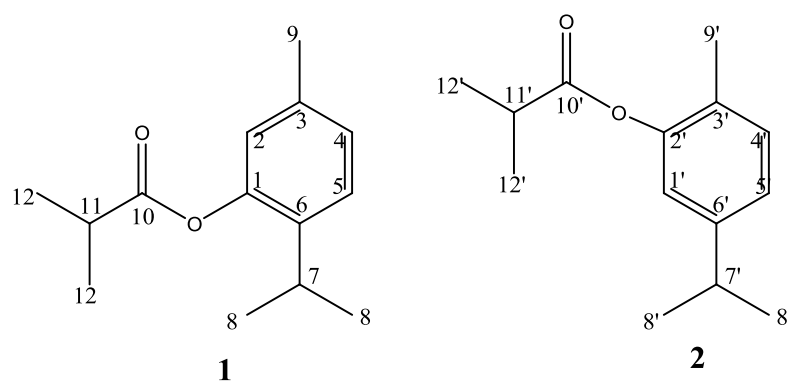
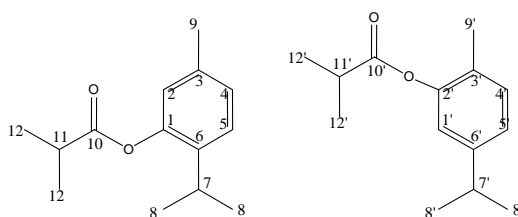


Figura 38. Proposta estrutural de sesquiterpenos isolados como uma mistura do óleo essencial de *A. australe*, 1) Timol isobutirato, 2) Carvacrol isobutirato. Para tornar a comparação entre as duas estruturas mais didática a numeração do composto Carvacrol isobutirato (2) não foi iniciada no carbono de maior prioridade, que deveria ser o do grupo isobutirato

Tabela 13. Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C da mistura de majoritários

Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)
1	145,926 (CAR)	
2	122,671 (CHAR)	7,09 (s, 1H)
3	135,539 (CAr)	-
4	127,070 (CHAR)	7,13 (d, 1H, $J=7,8\text{Hz}$)
5	126,917 (CHAR)	6,99 (dd, 1H, $J=4,3\text{Hz}$, $J=12,4\text{Hz}$)
6	136,479 (CAr)	-
7 e 7'	27,167 (CH)	2,82 (m, 1H)
8	19,006 (CH ₃)	1,18 (d, 12H, $J=2,7\text{Hz}$)
9	21,098 (2 X CH ₃)	2,33 (s, 6H)
10	175,808 (C=O)	-
11' e 11	34,252 (CH)	2,97 (tdd, 1H, $J=5,2\text{Hz}$, $J=6,6\text{Hz}$, $J=10,1\text{Hz}$)
12	22,868 (2 X CH ₃)	1,34 (d, 6H, $J=2,2\text{Hz}$)
1'	121,853 (CHAR)	6,78 (s, 1H)
10'	175,716 (C=O)	-
12'	22,927 (CH)	1,32 (d, 1H, $J=2,2\text{Hz}$)
2'	148,011 (CAR)	-
3'	139,656 (CAr)	-
4'	127,162 (CHAR)	7,18 (d, 1H, $J=7,9\text{Hz}$)
5'	126,242 (CHAR)	6,84 (d, 1H, $J=8,1\text{Hz}$)
6'	136,992 (CAr)	-
8'	20,793 (CH ₃)	1,20 (d, 3H, $J=2,7\text{Hz}$)
9'	19,074 (2 X CH ₃)	2,31 (s, 6H)

5.2.2.1.2 Hidrólise alcalina da mistura AA1

Para comprovar as estruturas dos dois componentes, a mistura foi submetida a uma reação de hidrólise (**item 4.11.1**). Como resultado desta hidrólise, pode ser observado nos cromatogramas da **Figura 39**, que mostra a comparação da mistura antes e depois da hidrólise. Observa-se a formação de dois componentes, timol e carvacrol, já existentes naturalmente no óleo (**componentes 7 e 8 na Tabela 12**), na proporção de aproximadamente 2:1. Estes resultados confirmam as estruturas propostas anteriormente.

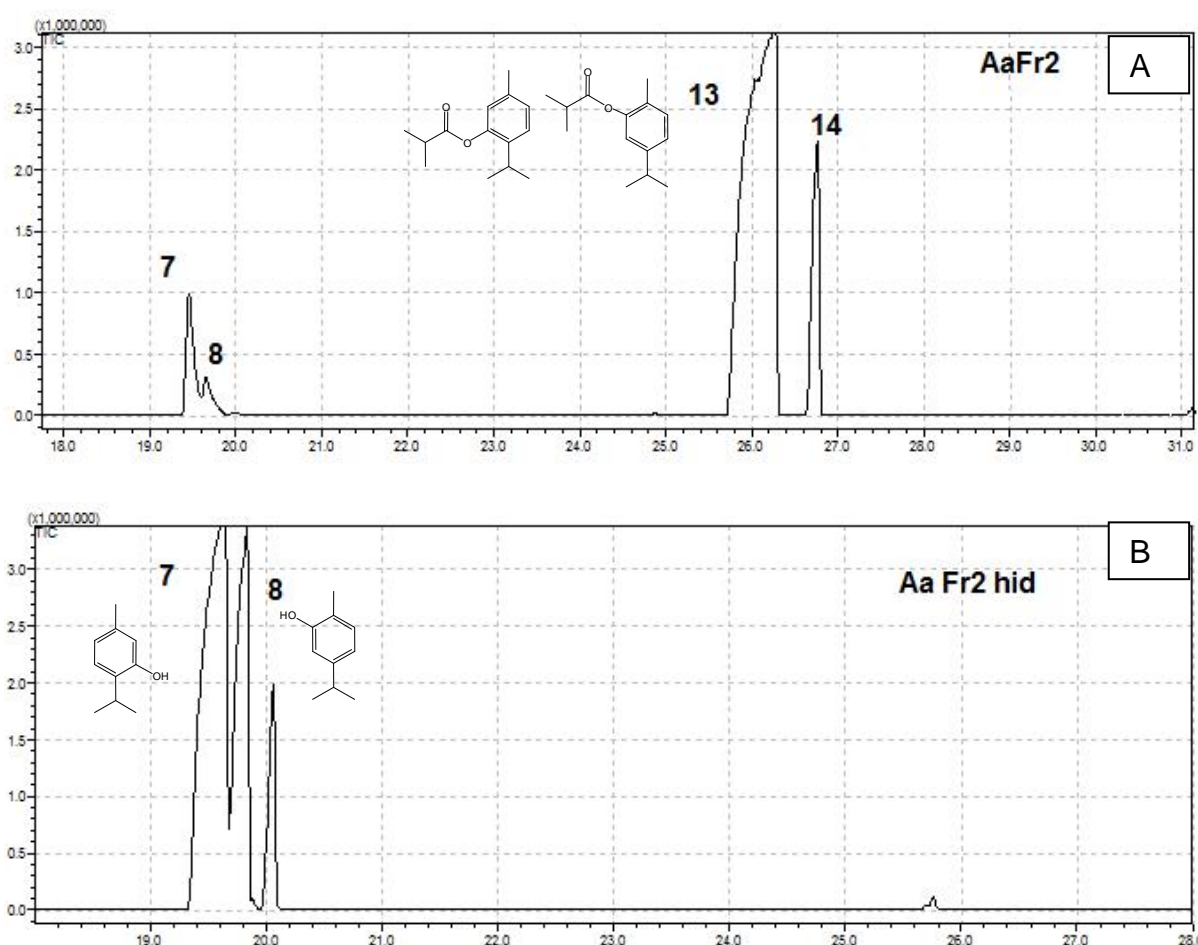


Figura 39. Comparação dos perfis cromatográficos da fração AaFr2 das folhas de *A.australe* (A), e a mesma fração AaFr2 após a reação de hidrólise (AaSMra hidrolisado) (B). A coluna utilizada é a 5MS, CCSF de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50°C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4°C min⁻¹

5.2.3 Determinação das atividades biológicas *in vitro* dos óleos essenciais de *A. australe*

5.2.3.1 Teste de Atividade Antioxidante pelo Método do radical livre DPPH

As amostras selecionadas para este teste foram os óleos voláteis das raízes de *A. australe* de Frederico Westphalen, Santa Maria e Três de Maio, além da amostra das partes aéreas de Santa Maria. A concentração inibitória de 50% (IC₅₀) no teste antioxidante para amostras de **AaFWra**, **AaTMra**, **AaSMra**, **AaSMPA** e padrão BHT foram respectivamente: 245,97 µg/mL; 167,64 µg/mL; 31,15 µg/mL; 26,45 µg/mL; 11,87 µg/mL.

O gráfico com as atividades está detalhado na **Figura 40**, onde se pode verificar a efetividade da atividade do óleo essencial de Santa Maria, destaque para as partes aéreas onde a atividade apresentou-se mais próxima do padrão.

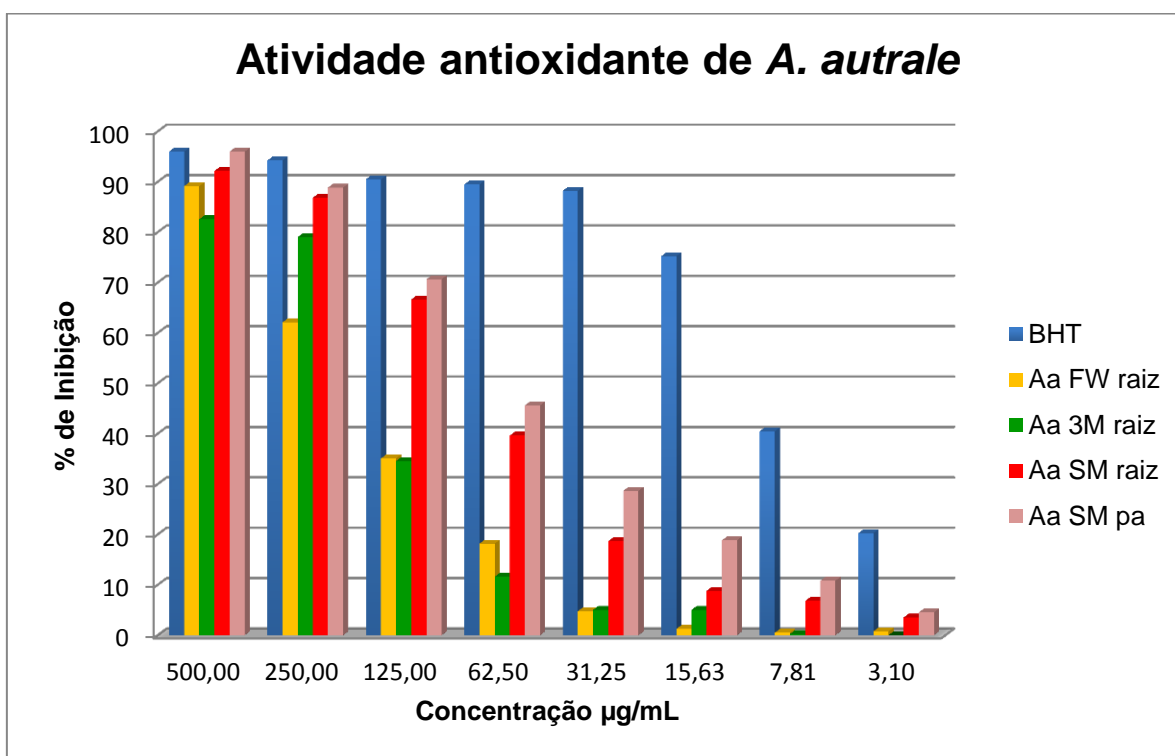


Figura 40. Atividade antioxidante das amostras: BHT- Butil hidroxi tolueno (padrão), AaFWra (amostra de Frederico Westphalen), Aa TM ra (amostra de Três de Maio), AaSMra (amostra de Santa Maria).

Como pode ser observado na **Tabela 12**, o óleo das partes aéreas tem maior quantidade de timol (22,72%) e carvacrol (12,42%) quando comparado ao óleo das raízes que possui 9,18% de timol e 1,28% de carvacrol. Esta diferença na concentração destes dois fenilpropanóides podem explicar a maior eficiência do óleo **AaSMpa** na diminuição dos radicais livres, uma vez que os dois compostos em questão tem excelente atividade antioxidante (LIN, 2009).

5.2.3.2 Atividade antimicrobiana

O método utilizado para esta análise foi o de microdiluição em caldo. Para isso, foram utilizadas as amostras dos óleos voláteis das raízes e partes aéreas de *A. australe* de Frederico Westphalen, Santa Maria e Três de Maio. Os resultados de CIM e CBM/CFM para os óleos de *A. australe* estão demonstrados na **Tabela 14**.

Tabela 14. Resultados de CIM, CBM e CFM para os óleos voláteis *A. australe*

M O _a	Aa TM ra		Aa TM pa		Aa FW ra		Aa FW pa		Aa SM ra		Aa SM pa		Padrão ^c
	CIM ^b	CBM ^b	CIM ^b	CBM ^b	CIM ^b	CBM ^b	CIM ^b	CBM ^b	CIM ^b	CBM ^b	CIM ^b	CBM ^b	CIM ^b
S a	1,25	>5	0,62	>5	0,62	5	1,25	10	1,25	>10	2,5	>10	3,12 x10 ⁻³
S e	2,5	>5	1,25	>5	2,5	>5	0,62	10	2,5	>10	1,25	10	3,12 x10 ⁻³
B s	2,5	>5	1,25	>5	1,25	>5	2,5	10	2,5	10	1,25	10	3,12 x10 ⁻³
S p	2,5	>5	2,5	>5	1,25	>5	1,25	10	2,5	>10	1,25	10	3,12 x10 ⁻³
S s	2,5	>5	1,25	>5	1,25	>5	1,25	10	2,5	10	0,62	5	3,12 x10 ⁻³
E c	5	>5	1,25	>5	1,25	>5	2,5	>10	1,25	>10	0,62	10	3,12 x10 ⁻³
P a	2,5	>5	2,5	>5	2,5	>5	5	>10	10	>10	2,5	>10	3,12 x10 ⁻³
S g	5	>5	1,25	>5	1,25	>5	0,62	10	10	>10	2,5	10	3,12 x10 ⁻³
M O _a	CIM ^b	CFM ^b	CIM ^b	CFM ^b	CIM ^b	CFM ^b	CIM ^b	CFM ^b	CIM ^b	CFM ^b	CIM ^b	CFM ^b	CIM ^b
C a	5	5	1,25	5	1,25	2,5	10	10	5	>10	5	>10	6,25 x10 ⁻³
C t	1,25	1,25	2,5	5	2,5	2,5	10	10	10	>10	5	>10	6,25 x10 ⁻³
C n	1,25	2,5	1,25	5	1,25	1,25	2,5	10	1,25	>10	5	5	10,3 x10 ⁻³
S c	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	5	10	10	10	>10	5	10	5,15 x10 ⁻³

^a ATCC (American Type Culture Collection); ^b em mg.mL⁻¹; ^c Cloranfenicol para bactérias e nistatina para levedura; TM ra: amostra das raízes de Três de Maio, TM pa: amostra das partes aéreas de Três de Maio, SM ra: amostra das raízes de Santa Maria, SM pa: amostra das partes aéreas de Santa Maria, FW ra: amostra das raízes de Frederico W., FW pa: amostra das partes aéreas de Frederico W., Laj ra: amostra das raízes de Lageado. A abreviação das cepas segue a mesma ordem da tabela das atividades antimicrobiana de *C. clematidea* (Tabela 9)

Com excessão dos óleos **AA TM pa** e **AA SM ra**, os óleos testados apresentaram uma significativa atividade bacteriostática (abaixo de 2 mg/ mL) frente a maioria das cepas testadas (Tabela 14).

Além disso, os óleos de Santa Maria e o óleo **AA FW pa** não apresentaram atividade fungicida significativa nas diluições testadas. Destaque é dado a atividade fungicida (1,25 mg/ mL) do óleo **Aa TM ra** frente a *Candida tropicalis* e ao óleo **Aa FW ra** (1,25 mg/ mL) frente ao *C. neoformans* (Tabela 14). A característica destes óleos, em relação aos demais estudados neste trabalho, é a presença, em concentrações variadas, de componentes fenilpropanóides, como timol, carvacrol e os correspondentes isobutiratos. Os compostos carvacrol e timol tem comprovada

atividade antimicrobiana (LIN, 2009) o que poderia estar influenciando na presença de atividade antimicrobiana dos presentes óleos. Para verificar a influência da mistura dos isobutiratos na atividade dos óleos, a mesma foi testada para a determinação da atividade antimicrobiana (**Tabela 15**).

Tabela 15. Resultados de CIM, CBM e CFM para mistura majoritária isolada de *A. australe*.

Características	Microorganismos ^a	AA1		Padrão ^c
		CIM ^b	CBM ^b	CBM ^b
Gram-positivos	<i>Staphylococcus aureus</i>	200	200	3,12
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	50	>200	3,12
	<i>Bacillus subtilis</i>	100	200	3,12
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	100	>200	3,12
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	100	>200	3,12
Gram-negativos	<i>Escherichia coli</i>	25	200	3,12
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	200	>200	3,12
	<i>Shiguelia sonnei</i>	25	200	3,12
Características	Microorganismos	CIM ^b	CFM ^b	CFM ^b
Fungos	<i>Candida albicans</i>	100	>200	6,25
	<i>Candida tropicalis</i>	50	>200	6,25
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	100	100	10,3
	<i>Sacharomyces cerivisae</i>	100	200	5,15

^a ATCC (American Type Culture Collection); ^b em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; ^c Cloranfenicol para bactérias e nistatina para levedura;

Estudos anteriores com carvacrol isobutirato e timol isobutirato obtidos sinteticamente frente a cinco bactérias: *S. mutans*, *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *S. aureus*, demonstraram que o segundo composto apresentou atividade (CIM) frente a *S. mutans* (93.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$), frente *B. subtilis* (46.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e frente a *S. epidermidis* (46.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (MATHELA; SINGH; GUPTA, 2010). Enquanto o primeiro composto não apresentou atividades significativas.

Nos resultados apresentados no presente trabalho pode-se constatar que a mistura dos referidos compostos foi mais efetiva frente as bactérias Gram negativas *E. coli* e *S. sonnei* com resultados expressivos de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para CIM e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$

para CBM (**Tabela 15**). De uma maneira geral **AA1** também apresentou atividade fungiostática (com valores variando de 50 a 100 µg/mL) e atividade fungicida de 100 µg/mL frente a *Cryptococcus neoformans*. Como a literatura relata que timol isobutirato é o único componente com atividade antimicrobiana (MATHELA; SINGH; GUPTA, 2010), possivelmente nesta mistura, a atividade apresentada seja atribuída exclusivamente ao mesmo.

5.3 Estudo dos óleos essenciais de *T. minuta*

Família : Asteraceae

Esta espécie foi selecionada para este estudo por ser muito comum no RS, considerada como praga nas lavouras e por ser uma espécie utilizada popularmente como medicinal e muito aromática.

Para este estudo, foram coletadas duas amostras distintas das partes aéreas de *T. minuta* em Santana do Livramento. Observou-se que esta planta tem um crescimento limitado (entre 20-30 cm), quando cresce em solos pobres (**SN**), como campos esgotados pela cultura ou entre eucaliptos. Quando a mesma espécie tem seu habitat em terrenos ricos em nutrientes (**CN**), ainda não esgotados pela agricultura, a mesma apresenta uma aparência mais viçosa e cresce até aproximadamente 1 m de altura.

Para comparação da influência do solo na composição dos óleos voláteis, foram coletadas uma amostra na localidade de Pinheira (SC), próxima a praia, cuja população tem um aspecto muito parecido com a espécie de Santana do livramento coletado em solo pobre. As amostras foram codificadas como **SN** (sem nutrientes, **CN** (com nutrientes), e **FL** (Florianópolis).

5.3.1 Propriedades físicas e rendimentos dos óleos voláteis de *Tagetes minuta*

Os dados físicos obtidos para *T.minuta* estão descritos na **Tabela 16**. Todos os óleos apresentaram aspecto amarelo pálido.

Tabela 16. Dados físicos dos óleos essenciais de *Tagetes minuta*.

Amostra	Rendimento	d	α [0,05; CH ₂ Cl ₂]	η
(SN)	0,20%	0,9122	-34,5	1,4975
(CN)	1,07%	0,9233	-13,6	1,4650
(FL)	0,95%	0,9000	-12,9	1,5432

R – rendimento em porcentagem; d - densidade em g.mL⁻¹, α - rotação ótica e η - índice de refração das amostras da parte aérea de *T. minuta* do solo empobrecido (SN) e do solo com nutrientes (CN) de Santana do Livramento e a parte aérea da amostra de Florianópolis (FL)

5.3.2 Determinação dos constituintes do óleo das partes aéreas de *T. minuta*

Os óleos voláteis das partes aéreas de *T. minuta* foram submetidos à análise cromatográfica, sendo possível a identificação de parte dos constituintes químicos. As **Figuras 41, 42 e 43** ilustram o perfil cromatográfico das amostras, enquanto as respectivas constituições químicas encontram-se na **Tabela 17**.

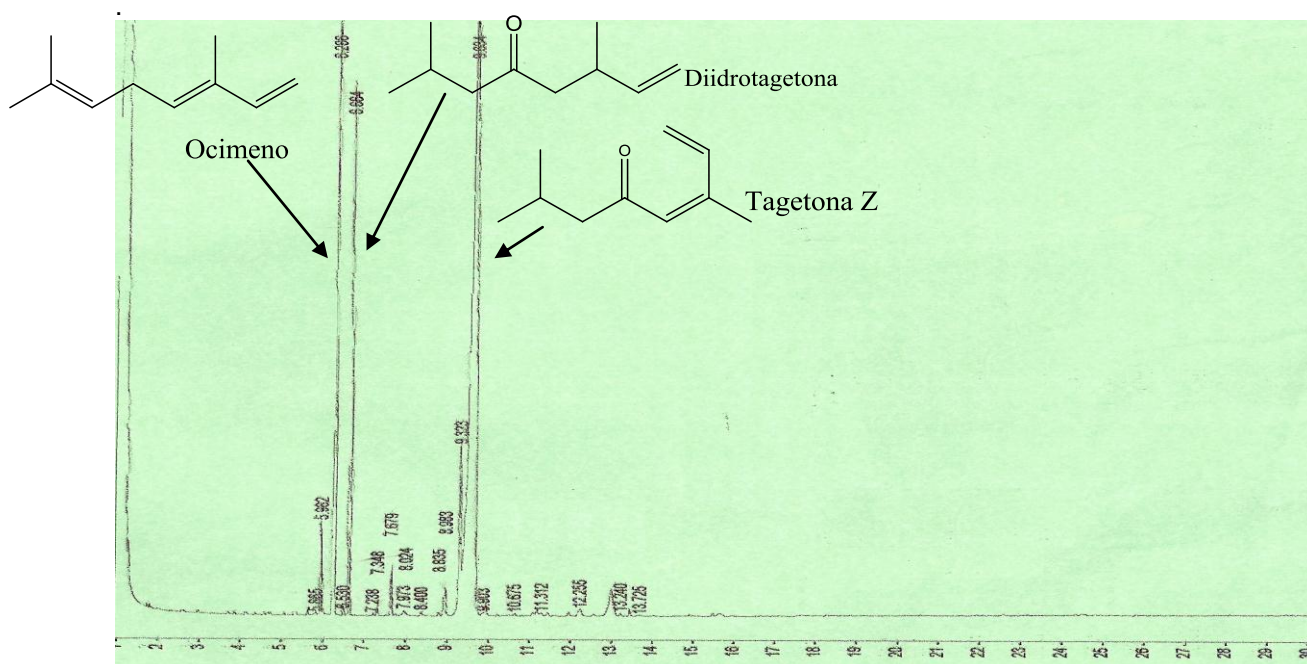


Figura 41. Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de *T. minuta*, coletada em Florianópolis-SC. A coluna utilizada é a DB5 de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50 °C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4 °C min⁻¹.

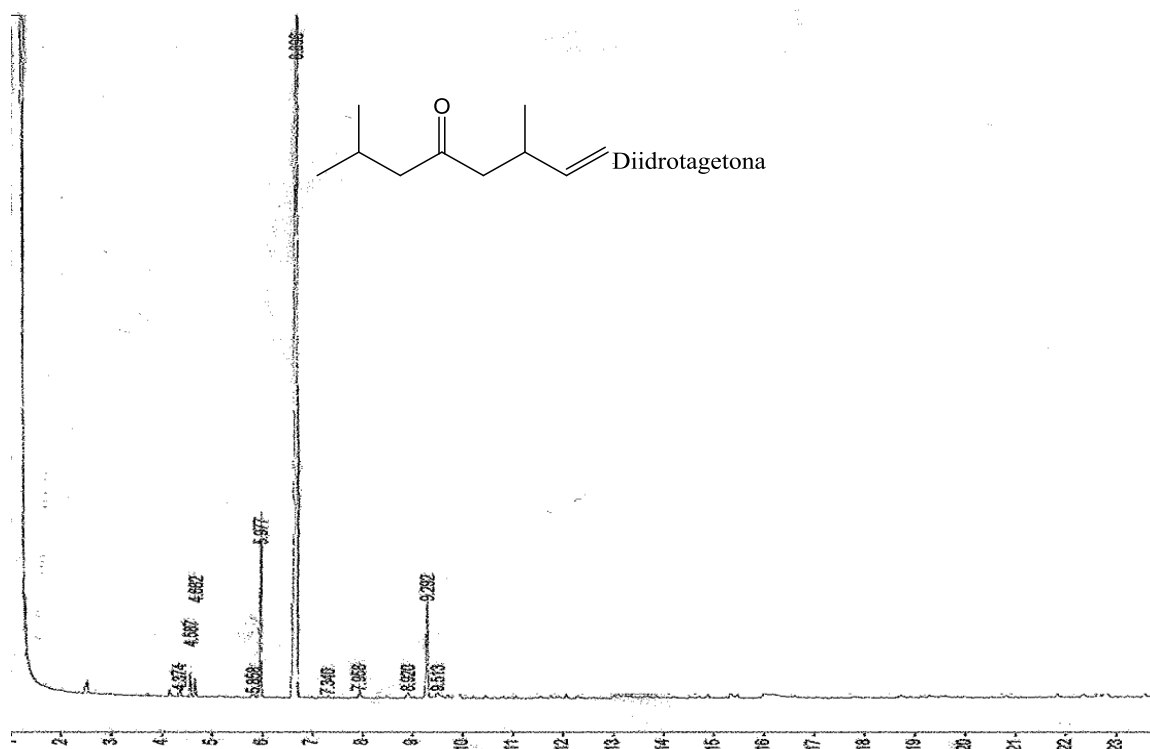


Figura 42. Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de *T. minuta*, coletada em Livramento CN. A coluna utilizada é a DB5 de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50 °C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4 °C min⁻¹.

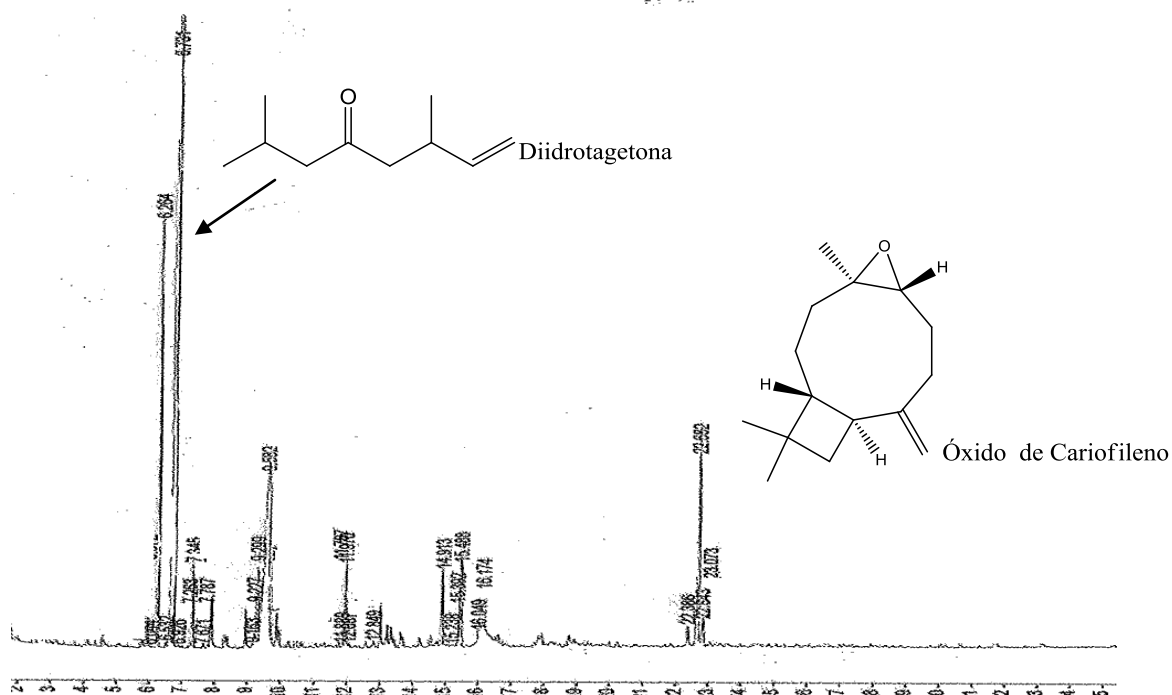


Figura 43. Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de *T. minuta* coletada em Livramento SN. A coluna utilizada é a DB5 de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50 °C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4 °C min⁻¹.

Tabela 17. Variação da composição dos óleos voláteis das partes aéreas de *T. minuta*.

Composto ^a	IK ^b	IK ^c	T.m FL	T.m SN	T.m CN	
			Quant (%)	Quant (%)	Quant (%)	
α -Ocimeno	1022	1037	1,68	-	8,76	CG-EM
β -Ocimeno	1034	1050	19,13	6,63	-	CG-EM
Diidrotagetona	1049	1053	11,30	57,15	75,6	CG-EM, RMN
α -Terpinoleno	1073	1089	1,2	1,4	-	CG-EM,
NI	1139		-	1,89	1,7	CG-EM
Diidrolinalol	1140	1135	4,787	-	5,1	CG-EM,
Tagetona E	1148	1144		9,89	-	CG-EM
Tagetona Z	1150	1152	53,49	4,14	1,9	CG-EM
NI	1157		-	-	1,75	CG-EM
p-Cimeno-8-ol	1160	1183	-	-	1,39	CG-EM
Piperitona b	1225	1253	-	1,87	-	CG-EM
NI	1257		1,69	-	-	CG-EM
Piperitenona	1316	1343	-	1,98	-	CG-EM
Óxido de piperitona	1335	1369	-	2,15	-	CG-EM
NI	1356		-	1,32	-	CG-EM
NI	1442		1,34	-	-	CG-EM
Óxido de Cariofileno	1569	1583	-	5,39	-	CG-EM
Total			94,624	93,813	96,2	

^a Componentes listados em ordem de eluição na coluna DB5; ^b Índice de Kovats na coluna DB5; ^c Índice de Kovats da literatura; NI: não identificado; Amostras das partes aéreas de *T. minuta* de um solo com nutrientes (CN) e de um solo sem nutrientes (SN) localizados em Santana do Livramento-RS e as partes aéreas de *T. minuta* de Florianópolis-SC (FL).

Todos os componentes identificados nos três óleos essenciais são comumente referidos no gênero *Tagetes* (EL-DEEB, 2004). A diidrotagetona é o componente majoritário dos dois óleos coletados em Santana do Livramento, sendo que a amostra do solo com nutrientes (CN) apresenta o maior conteúdo deste componente (75,6 %), enquanto que a amostra coletada em Santa Catarina, apresentou apenas 11,3% de diidrotagetona. Por outro lado, o óleo de Santa Catarina apresenta um grande conteúdo de Z-tagetona (53,5%), quase inexistente

nas outras amostras. Este resultado é um exemplo da variação da constituição química de uma planta com as condições ambientais, solo e localização.

5.3.2.1 Identificação do componente majoritário do óleo de *T. minuta* CN

Com a finalidade de se identificar e usar como padrão CG para identificar outros componentes, decidiu-se isolar o componente principal do óleo **CN**, conforme descrito na parte experimental (**item 4.12**). Desta maneira foi isolado o componente majoritário do óleo, com grau de pureza suficiente para ser analisado por RMN (**Figura 44**).

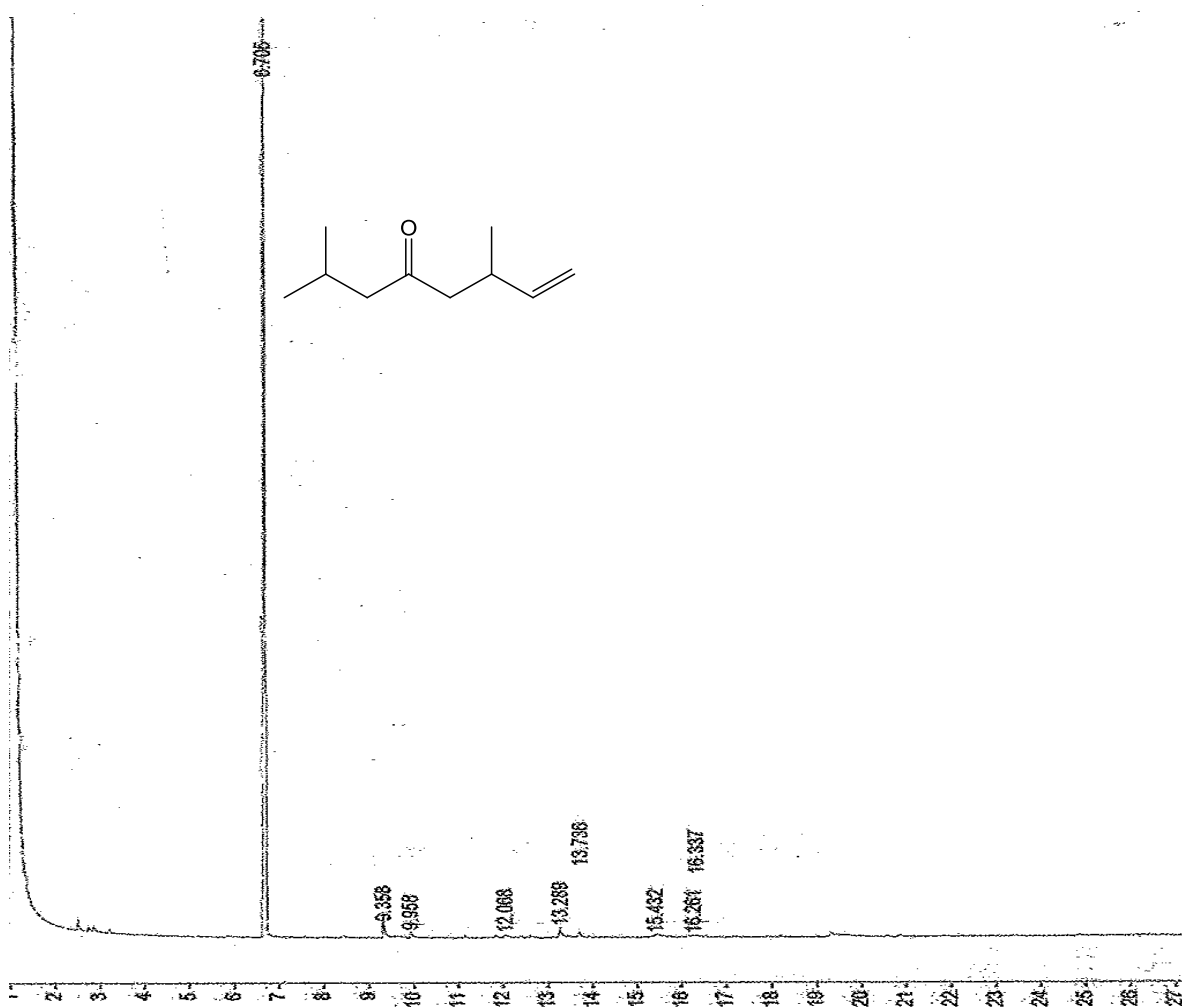


Figura 44. Perfil cromatográfico da fração 9 da coluna do óleo essencial das partes aéreas de *T. minuta* CN, coletada em . A coluna utilizada é a DB5 de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50 °C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4 °C min⁻¹.

O espectro de RMN de carbonos desta amostra (**Figura 45**) mostrou a presença de 10 carbonos de um monoterpene. O esqueleto é composto de uma

carbonila (209,1 ppm), dois carbonos olefínicos, sendo um deles um metileno (112 ppm) e um metino (142 ppm). Demais carbonos, três metilas, um metínico e dois metilênicos, aparecem em campo alto, entre 53 e 9 ppm. O espectro de hidrogênios (**Figura 46**) mostra que duas metilas são equivalentes, e que absorvem em 0,90 ppm, com um $J=6,8$ Hz, caracterizando uma isopropila na estrutura e uma metila em 1,01 ppm, com $J=6,7$ Hz, ligada a um carbono da cadeia. Estes dados, juntamente com o dado de IK obtido do CG, corrobora com a estrutura da cetona conhecida como diidrotagetona (**Figura 47**).

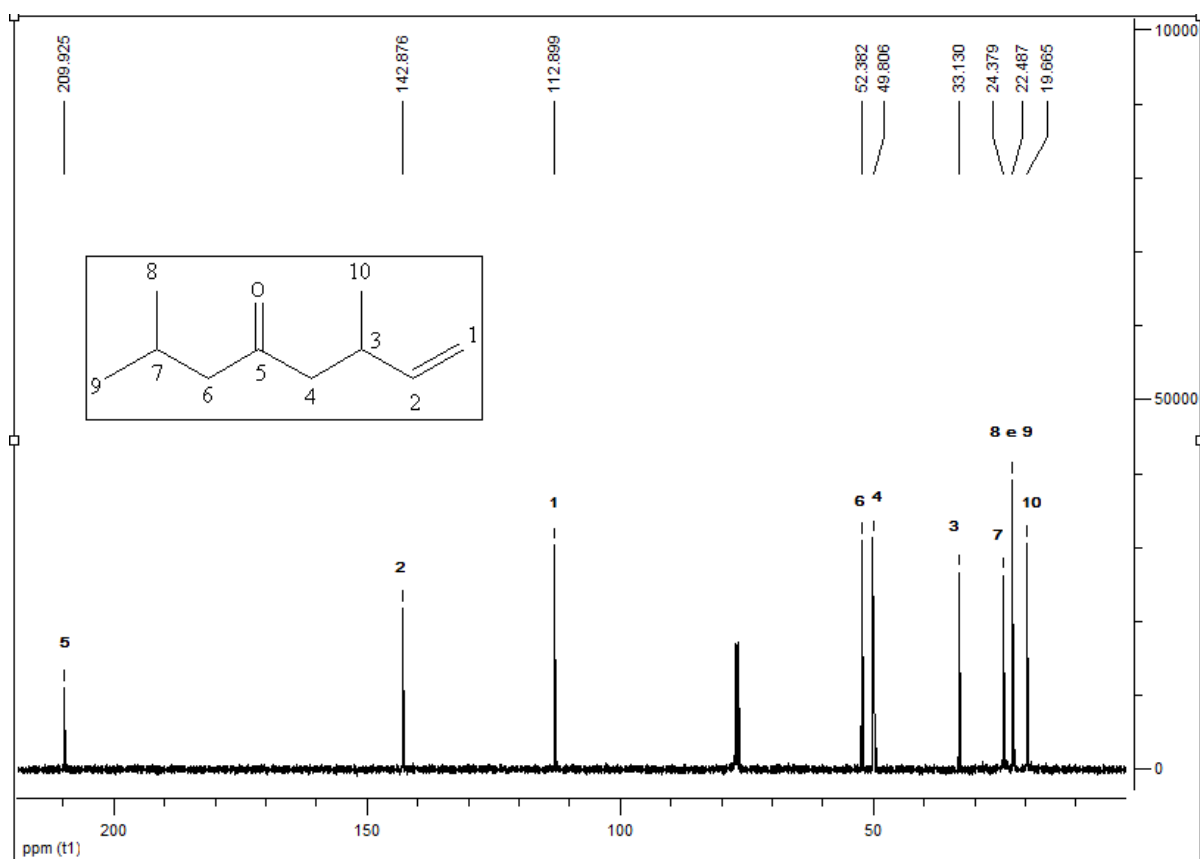


Figura 45. Espectro de RMN de ^{13}C a 400 MHz em CDCl_3 , do monoterpeno Diidrotagetona isolado de *T. minuta*.

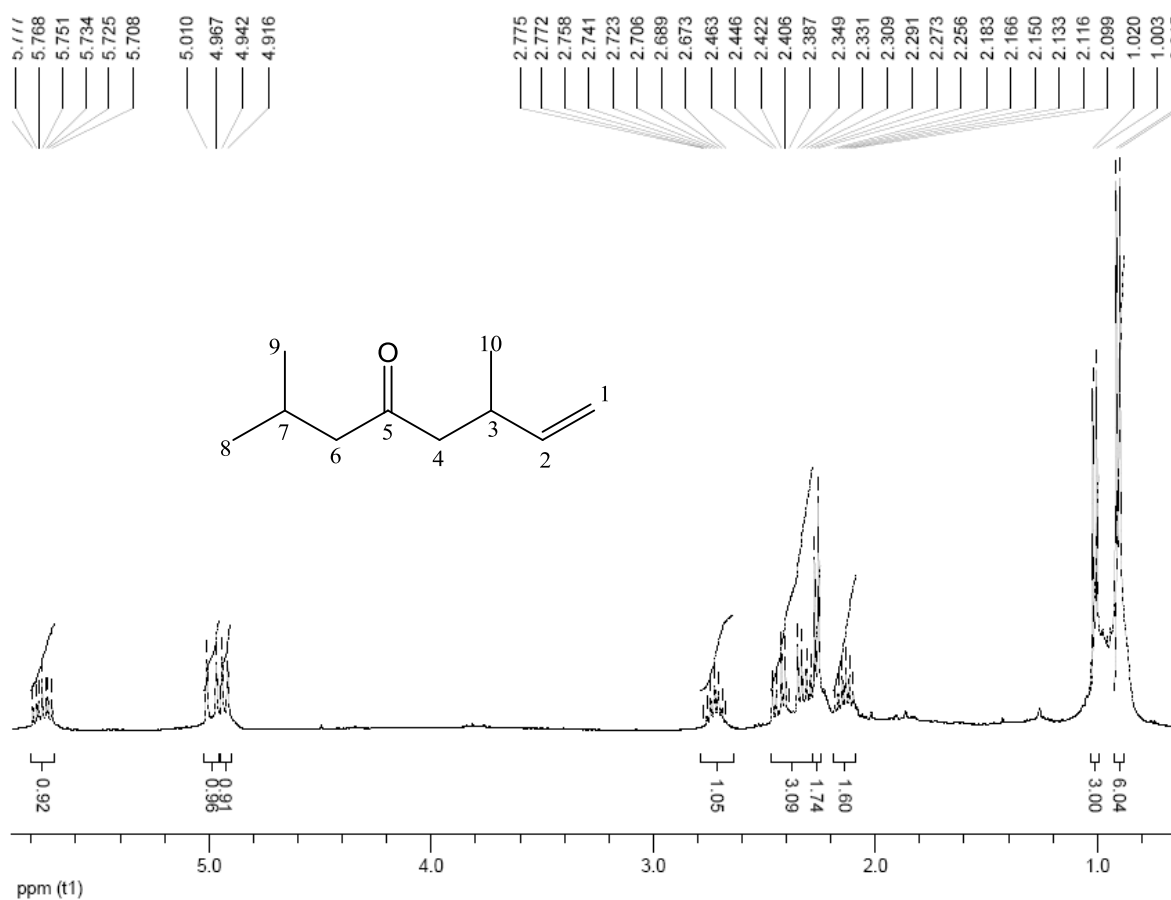


Figura 46. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz em CDCl₃, do monoterpene diidrotagetona.

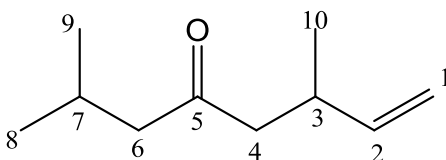


Figura 47. Estrutura do componente majoritário diidrotagetona isolado de *T. minuta* SN.

5.3.2 Determinação das atividades biológicas *in vitro* dos óleos essenciais de *T. minuta*

5.3.3.1 Teste de Atividade Antioxidante pelo Método do radical livre DPPH

As amostras selecionadas para este teste foram os óleos das partes aéreas das três amostras de *T. minuta*. As amostras testadas não apresentaram atividade antioxidante.

5.3.3.2 Atividade antimicrobiana

Para este teste, foram utilizadas as amostras **SN**, **FL** e de diidrotagetona pura, componente principal da amostra **CN**. A amostra CN não foi testada porque não havia quantidade suficiente para o teste. Os resultados de CIM e CBM/CFM para os óleos de *T. minuta* são demonstrados na **Tabela 18**.

Tabela 18. Resultados de CIM, CBM e CFM para os óleos voláteis *T. minuta*.

Carac	Microorganismos ^a	Tag min. SN		Tag FL		Diidrotagetona		Padrão ^c
		CIM ^b	CBM ^b	CIM ^b	CBM ^b	CIM ^d	CBM ^d	CIM ^b
Gram-positivos	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,25	>5	2,5	>10	0,1	>0,2	3,12 x10 ⁻³
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,25	>5	2,5	10	0,2	>0,2	3,12 x10 ⁻³
	<i>Bacillus subtilis</i>	2,5	>5	2,5	>10	-	-	3,12 x10 ⁻³
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	2,5	>5	2,5	>10	0,1	>0,2	3,12 x10 ⁻³
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2,5	>5	1,25	10	0,1	>0,2	3,12 x10 ⁻³
Gram-negativos	<i>Escherichia coli</i>	2,5	>5	2,5	>10	0,2	>0,2	3,12 x10 ⁻³
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,5	>5	2,5	>10	0,1	>0,2	3,12 x10 ⁻³
	<i>Shiguelia sonnei</i>	2,5	>5	5	>10	0,1	>0,2	3,12 x10 ⁻³
Caract.	Microorganismos	CIM ^b	CFM ^b	CIM ^b	CFM ^b	CIM ^d	CFM ^d	CIM ^b
Fungos	<i>Candida albicans</i>	0,62	0,62	1,25	5	0,1	0,2	6,25 x10 ⁻³
	<i>Candida tropicalis</i>	1,25	1,25	5	>10	N/T	-	6,25 x10 ⁻³
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,62	1,25	5	5	0,2	>0,2	10,3 x10 ⁻³
	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	0,62	1,25	1,25	>10	0,1	0,1	5,15 x10 ⁻³

^a ATCC (American Type Culture Collection); ^b em mg.mL⁻¹; ^c Cloranfenicol para bactérias e nistatina para levedura; ^d mg/mL. Tag min SN: Óleo das partes aéreas de *T. minuta* de Livramento solo sem nutrientes, Tag min FL: Óleo das partes aéreas de *T. minuta* de Florianópolis. Diidrotagetona: composto isolado de *T. minuta*.

Por se tratar de um composto isolado, a análise da atividade antimicrobiana da Diidrotagetona só é levada em conta para valores iguais ou inferiores a 0,1 mg/mL (DUARTE, 2004). Desta maneira, observando a **Tabela 18** este composto apresentou atividade bacteriostática frente a maioria das cepas testadas e também apresentou moderada atividade fungicida frente a *Sacharomyces cerevisiae*.

Estes resultados corroboram com as pesquisas de Hethelyi et al (1986), que determinaram a atividade de cinco componentes secundários da *Tagetes minuta*, dentre eles a diidrotagetona, que apresentou excelente atividade antimicrobiana frente a maioria das 40 cepas de bactérias e fungos e demonstraram o potencial antifúngico e antibacteriano do óleo essencial de *Tagetes minuta* e teve 100% de efeito inibitório sobre as bactérias Gram positivas e 95 % de efeito inibitório sobre as bactérias Gram negativas e 100% de efeito inibitório sobre fungos.

Quanto aos OE, pode-se verificar na **Tabela 18** que os dois apresentaram moderada atividade bacteriostática (valores de 0,5 a 1,6 mg/mL) frente apenas as bactérias do gênero *Staphylococcus*.

Destaque é dado a atividade fungicida do óleo **SN**, que foi efetivo frente a todos os fungos testados, principalmente frente a *Cryptococcus neoformans*, *Sacharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* (CIM= 0,62 mg/mL). No caso de *Candida albicans*, o CFM teve o mesmo valor de CIM, o que torna o óleo fungicida e fungioestático nesta quantidade. O óleo de Florianópolis apresentou uma diminuição da efetividade fungioestática e fungicida frente às mesmas cepas. As atividades realizadas neste trabalho frente a fungos e bactérias estão parcialmente em concordância aos estudos de Hethelyi et al (1986) que demonstraram o potencial antifúngico e antibacteriano do óleo essencial de *Tagetes minuta* com resultados de 100% efeito inibitório sobre as bactérias Gram positivas e 95 % de efeito inibitório sobre as bactérias Gram negativas e 100% de efeito inibitório sobre fungos.

O que diferencia o óleo coletado em Livramento em solos com menos nutrientes (**SN**) dos demais é a presença de *E*-tagetona (10%), piperitona (2%), óxido de piperitona (1,3%) e de óxido de cariofileno (5,4%), inexistentes nos demais óleos. Esta diferença parece ser determinante para a atividade antifúngica, uma vez que o referido óleo é mais ativo frente a fungos. Todos estes achados estão em concordância com trabalhos encontrados na literatura (SINGH, 1992). Além disso, a presença de 57,13 % de dihidrotagetona na composição do óleo **SN** também pode explicar a superioridade da atividade frente a fungos do mesmo quando comparado ao óleo **FL**.

5.4 Estudo dos óleos voláteis das amostras de *Julocroton humilis*

Família Euphorbiaceae

Esta espécie foi selecionada para este trabalho, por se observar que no local de coleta nenhum mamífero se alimenta da referida planta. Além disso, esta espécie possui apenas um trabalho científico sobre seus metabólitos fixos e nenhum a respeito de seus óleos essenciais.

Foram analisadas três amostras desta planta uma coletada em 2008 (**Jh08**) e reanalisada em 2010 (**Jh08d**) e outra amostra coletada em 2010 (**Jh10**).

5.4.1 Propriedades físicas e rendimentos dos óleos voláteis de *Julocroton humilis*

As duas amostras frescas (**Jh08 e Jh10**) de óleos desta espécie apresentaram uma coloração vermelha intensa.

O rendimento médio para a extração do óleo volátil das partes aéreas de 2008 (**Jh08**) por hidrodestilação foi de 0,32%. A densidade (d) em g.mL⁻¹ da amostra foi de 0,879 e o índice de refração (η) foi de 1,4936 enquanto o α [0,05; CH₂Cl₂] foi de +21,7.

O rendimento médio para a extração do óleo volátil das partes aéreas de 2010 (**Jh10**) por hidrodestilação foi de 0,28%. A densidade (d) em g.mL⁻¹ da amostra foi de 0,869 e o índice de refração (η) foi de 1,4934 enquanto o α [0,05; CH₂Cl₂] foi de +27,3.

O óleo de 2008 também foi reavaliado após dois anos e dois meses de estocagem em refrigerador (com temperatura controlada de 4 a 10° C), sendo desta maneira renomeada **Jh08d**. Pôde-se constatar a mudança da coloração do óleo que passou a apresentar aspecto vermelho escuro a marrom, além de um aumento na sua viscosidade. A densidade (d) em g.mL⁻¹ da amostra foi de 0,923 e o índice de refração (η) foi de 1,4976 enquanto o α [0,05; CH₂Cl₂] foi de +38,9.

5.4.2 Determinação dos constituintes do óleo das partes aéreas de *J. humilis*

Os óleos voláteis das partes aéreas de *J. humilis* foram submetidos à análise cromatográfica, sendo possível parte da identificação dos constituintes químicos. As **Figuras 48 e 49** ilustram o perfil cromatográfico das amostras coletadas em 2008

(**Jh08**) e 2010 (**Jh10**) enquanto as respectivas constituições químicas encontram-se na **Tabela 19**. A numeração dos constituintes apresentada nos cromatogramas corresponde à numeração dos mesmos na **Tabela 19**.

5.4.2.1 Degradação observada no óleo volátil de *J humilis*.

Após definição da composição química do óleo e estocagem sob-refrigeração, durante 2 anos e dois meses, a **amostra Jh08** foi reavaliada. A suspeita de degradação confirmou-se quando se analisou novamente o óleo em CG-EM (**Figura 50**). Desta maneira esta amostra foi renomeada e passou a ser codificada **Jh08d**. Este fato tornou a comparação entre os três óleos essenciais de extrema importância (**Tabela 19**).

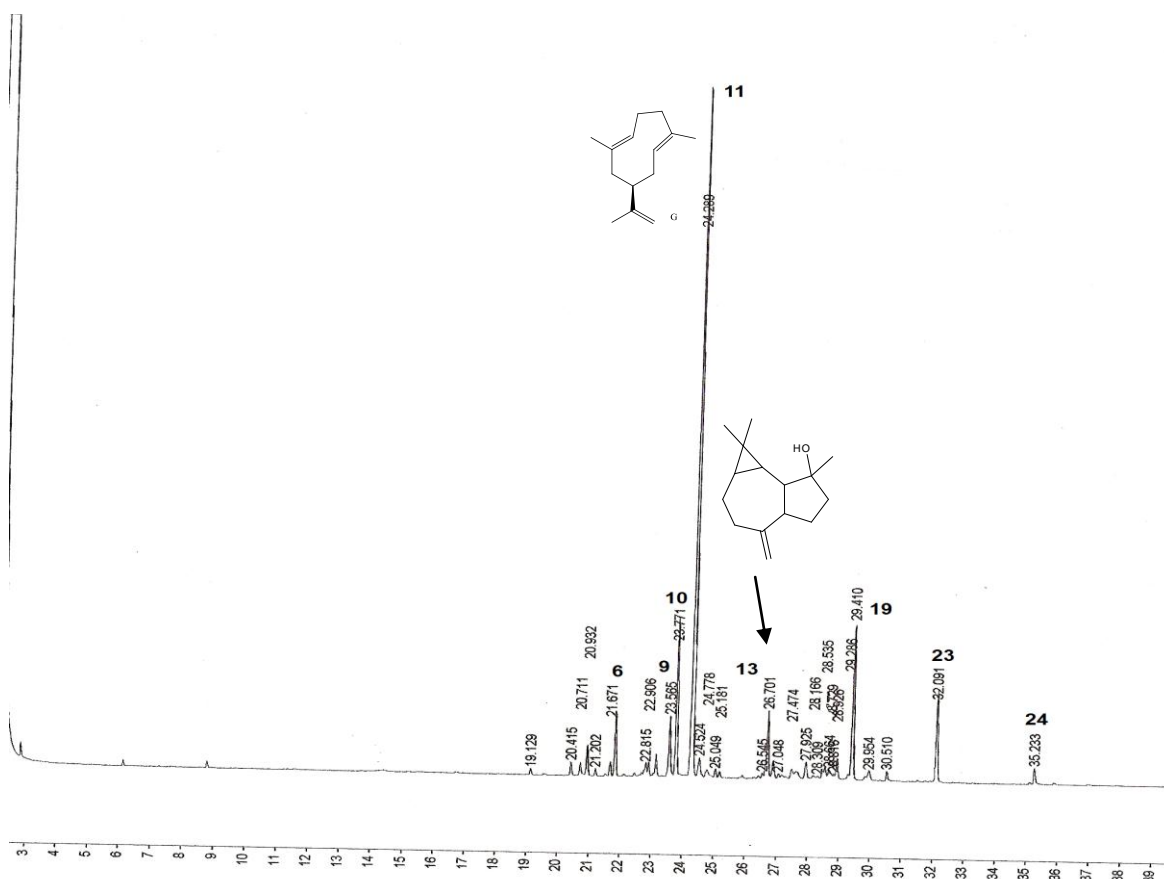


Figura 48. Perfil cromatográfico do óleo das partes aéreas de *J. humilis* de 2008 (Jh08). Utilizando coluna DB5, CCSF de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50 °C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4 °C min⁻¹.

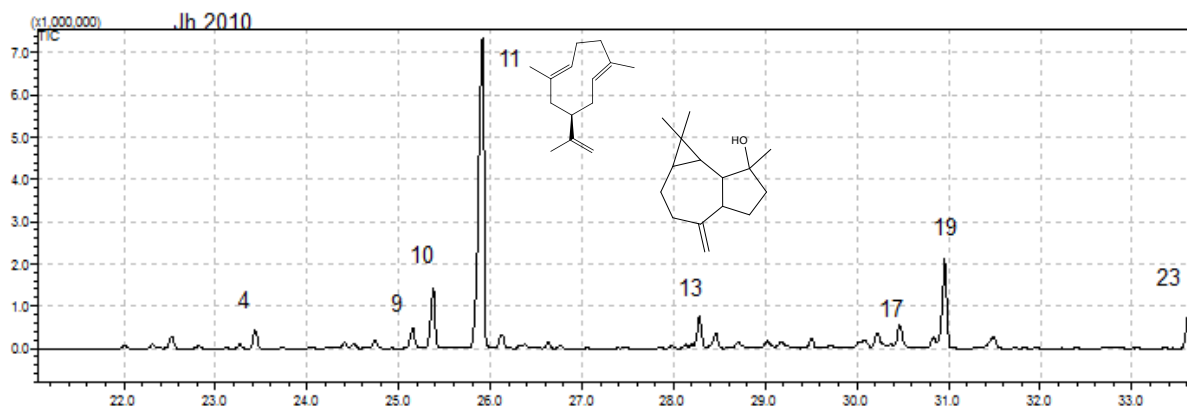


Figura 49 Perfil cromatográfico do óleo das partes aéreas de *J.humilis* de 2010 (**Jh10**). Utilizando coluna 5SM, CCSF de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50 °C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4 °C min⁻¹.

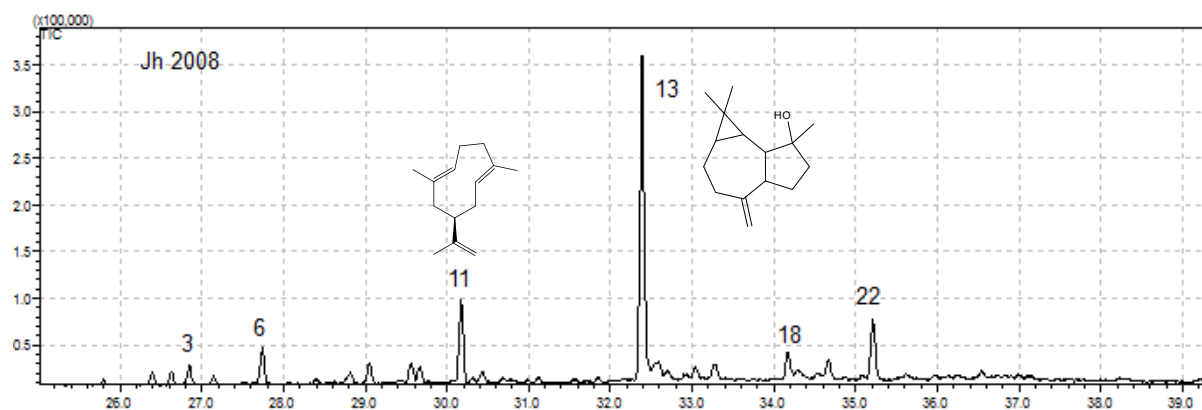


Figura 50. Perfil cromatográfico do óleo das partes aéreas de *J.humilis* de 2008 que foi reavaliado em 2010 (**Jh08d**). Utilizando coluna 5MS, CCSF de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50 °C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4 °C min⁻¹.

Tabela 19. Comparação entre componentes dos óleos de *J. humilis*.

Nº	Componentes ^a	IK ^b	IK ^c	Jh08	Jh 08d	Jh10	Identificação
1	Ni	1387		0,73	1,76	-	CG-EM
2	Ni	1393		0,7	1,48	-	CG-EM
3	β-Elemeno	1400	1391	0,4	2,22	1,31	CG-EM
4	NI	1408		0,4	1,08	2,23	CG-EM
5	NI	1424		1,3			
6	(E)-cariofileno	1426	1419	3,87	4,55	-	CG-EM
7	β-Chamigreno	1459		0,6	1,1	-	CG-EM,
8	NI	1466		3,81	2,87	1,05	CG-EM
9	Aromadendreno	1482	1460	4,59	2,57	2,4	CG-EM,
10	Germacreno D	1492	1485	11,16	2,15	7,7	CG-EM
11	Germacreno A	1520	1509	42,27	10,9	51,09	CG-EM
12	δ-cadineno	1528	1514	1,4	1,38	1,85	CG-EM
13	Espatuleno	1577	1578	4,55	47,32	3,76	CG-EM
14	Globulol	1578	1585	1,41	1,66	1,61	CG-EM
15	Óxido de Cariofileno	1582	1583	1,12	-	1,94	CG-EM
16	NI	1589		2,37	-	2,39	CG-EM
17	α-cadinol	1639	1654	0,96	1,29	3,35	CG-EM
18	NI	1641		1,48	2,51	1,3	CG-EM
19	γ-Gurjuneno epóxido	1650		10,9	4,06	12,5	CG-EM
20	NI	1664		0,37	-	-	CG-EM
21	NI	1677		0,23	2,56	-	CG-EM
22	NI	1697			8,44	-	CG-EM
23	NI	1715		5,35	-	5,32	CG-EM,
24	NI	1734		0,8			
Total				99,37	99,9	99,8	

^a Componentes listados em ordem de eluição na coluna DB5; ^b Índice de Kovats na coluna DB5; ^c Índice de Kovats da literatura; NI: não identificado; Jh10: amostra coletada em 2010, Jh 08: amostra coletada em 2008, Jh 08d: amostra degradada coletada em 2008 e reanalisada em 2010.

De acordo com a **Tabela 19**, a análise cromatográfica indicou que as amostras de óleo analisadas ainda frescas (**Jh08 e Jh10**) possuem perfil cromatográfico semelhante, onde o composto majoritário comum aos dois foi identificado como sendo o sesquiterpeno Germacreno A (**Figura 51**), na proporção de 51,19% para a amostra **Jh10** e 42,27% para a amostra **Jh08**.

A diferença mais significativa entre as amostras de óleos frescos está na presença de (E)-Cariofileno (3,87%) no óleo de 2008, que está ausente no óleo mais recente. Apesar desta pequena diferença, esses resultados demonstram a conservação do perfil cromatográfico do óleo mesmo tendo se passado mais de dois anos entre as duas análises.

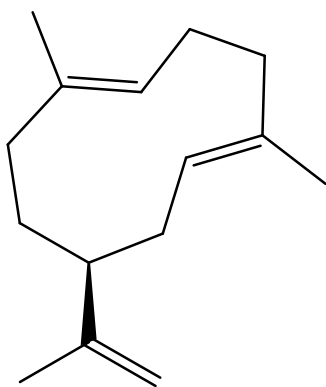


Figura 51. Germacreno A, terpeno majoritário de Jh10 e Jh08

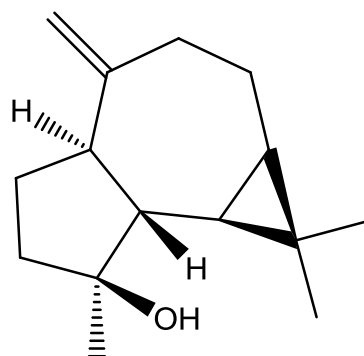


Figura 52. Epatulenol, terpeno majoritário de Jh08d

Em contrapartida, na amostra degradada (**Jh08d**) o componente majoritário identificado foi o sesquiterpeno Epatulenol (47,42%) (**Figura 52**). Quando as porcentagens dos terpenos Germacreno A e Epatulenol presentes nas três amostras são comparadas entre si, verifica-se uma inversão nas suas proporções, uma vez que, o componente Epatulenol majoritário no óleo degradado encontra-se na proporção de 4,55% na amostra de 2008 e 3,76% na amostra de 2010. Enquanto o componente Germacreno A majoritário nos óleos frescos, aparece em quantidade reduzida (10,9%) no óleo degradado (**Tabela 19**).

Estes resultados são indícios da degradação do óleo, mesmo a amostra tendo sido guardada em condições ideais (acondicionamento a baixas temperaturas, com vedação, em frasco âmbar e em estado anidro). Esta relativa instabilidade dos terpenóides acontece principalmente por reações de oxidação e polimerização, onde muitas vezes ocorre uma conversão quase total dos seus componentes (KÖLLNER, 2004).

5.4.3 Determinação das atividades biológicas *in vitro* dos óleos essenciais de *J. humilis*

5.4.3.1 Teste de Atividade Antioxidante pelo Método do radical livre DPPH

As amostras selecionadas para este teste foram os óleos voláteis de *J. humilis* de janeiro de 2010 e o óleo degradado de 2008. As amostras testadas não apresentaram atividade antioxidante.

5.4.3.2 Atividade antimicrobiana

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram utilizadas as amostras dos óleos voláteis de *J. humilis* de janeiro de 2010 (**Jh10**) e o óleo degradado de 2008 (**Jh08d**) Os resultados de CIM e CBM/CFM estão demonstrados na **Tabela 20** a seguir:

Tabela 20. Resultados de CIM, CBM e CFM para os óleos voláteis *J. humilis*.

Car	Microorganismos ^a	Jh10		Jh08d		Padrão ^c
		CIM ^b	CBM ^b	CIM ^b	CBM ^b	CIM ^b
Gram-positivos	<i>Staphylococcus aureus</i>	5	>10	>5	-	3,12 x10 ⁻³
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,5	>10	>5	-	3,12 x10 ⁻³
	<i>Bacillus subtilis</i>	10	>10	>5	-	3,12 x10 ⁻³
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2,5	10	>5	-	3,12 x10 ⁻³
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	5	>10	>5	-	3,12 x10 ⁻³
Gram-negativos	<i>Escherichia coli</i>	2,5	>10	>5	-	3,12 x10 ⁻³
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>10	-	>5	-	3,12 x10 ⁻³
	<i>Shigella sonnei</i>	10	>10	>5	-	3,12 x10 ⁻³
Car	Microorganismos	CIM ^b	CFM ^b			CIM ^b
Fungos	<i>Candida albicans</i>	>10	-	>5	-	6,25 x10 ⁻³
	<i>Candida tropicalis</i>	>10	-	>5	-	6,25 x10 ⁻³
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	>10	-	>5	-	10,3 x10 ⁻³
	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	>10	-	>5	-	5,15 x10 ⁻³

^a ATCC (American Type Culture Collection); ^b em mg.mL⁻¹; ^c Cloranfenicol para bactérias e nistatina para levedura;

Os resultados demonstraram a alta concentração dos óleos necessária para a inibição do crescimento microbiano (**Tabela 20**), evidenciando que os mesmos não apresentam fortes atividades antimicrobianas. De uma maneira geral o óleo fresco (**Jh10**) foi mais efetivo na inibição do crescimento bacteriano quando comparado ao óleo já degradado de 2008.

A relativa capacidade antimicrobiana da amostra **Jh10** pode ser atribuída a presença do sesquiterpeno Germacreno A (51,09%), com reconhecida capacidade antimicrobiana (HAMMER et al., 1999). Em contrapartida a diminuição deste mesmo

componente na amostra **Jh08d** (10.95%) poderia ser uma das causas da ausência de inibição de crescimento bacteriano.

Além disso, a presença significativa de espatulenol (47,32%), o qual possui conhecida atividade antimicrobiana (HAMMER et al., 1999), nesta amostra degradada não seria o suficiente para causar um aumento na atividade antimicrobiana. Resultado que pode estar sendo causado por um efeito antagônico de algum ou alguns dos outros componentes não identificados deste óleo degradado.

5.5 Estudo do óleo essencial volátil de *N. megapotamica*

Familia: Lauraceae

Esta espécie foi selecionada para este estudo por ser uma espécie utilizada popularmente como medicinal (BAITELLO et al., 2003).

A análise dos óleos de galhos e folhas da espécie em questão por cromatografia gasosa não indicou uma diferença quantitativa e qualitativa significativa na composição entre as amostras. Desta forma, os dados (exceto os rendimentos e dados físicos) destas amostras foram tratados juntos. Como já mencionado anteriormente as amostras foram coletadas entre os meses de outubro de 2010 e junho de 2011. Sendo assim estas amostras foram então divididas em:

- 1) amostras coletadas na primavera: **Nm gal A** (galhos) e **Nm fol A** (folhas)
- 2) amostras coletas no verão: **Nm gal B** (galhos) e **Nm fol B** (folhas)
- 3) amostras coletas no outono : **Nm gal C** (galhos) e **Nm fol C** (folhas)
- 4) amostras coletas no inverno: **Nm gal D** (galhos) e **Nm fol D** (folhas)

5.5.1 Degradação observada no óleo volátil de *N. megapotamica*.

Após definição da composição química do óleo e estocagem sob-refrigeração, durante 1 ano e um mês, a **amostra B** foi reavaliada onde observou-se que sua coloração permaneceu idêntica a original, mas apresentou um aumento na densidade, confirmado pela reavaliação de todos seus dados físicos (**Tabela 22**). Assim como também foram verificadas as alterações na rotação ótica (α) e no índice de refração (η). A suspeita de degradação confirmou-se quando se analisou novamente o óleo em CG-EM (**Figura 55**). Desta maneira esta amostra foi renomeada e passou a ser codificada **Bd**. Este fato tornou a comparação entre os óleos essenciais desta espécie de extrema relevância.

5.5.2 Propriedades físicas e rendimentos dos óleos voláteis de *N. megapotamica*

Os dados físicos das amostras da espécie em questão estão relacionados na **Tabela 22**, assim como seus rendimentos nas diferentes épocas do ano (**Tabela 21**). Além disso, a coloração apresentada por todas as amostras foi amarelo pálido.

No exame físico do óleo degradado **Nm fol Bd** pôde-se constatar somente um aumento na viscosidade.

Após a análise dos rendimentos (**Tabela 21**) verifica-se o baixo rendimento dos OEs no verão, sendo que estes achados podem ser justificados pela ocorrência de altas temperaturas o quê , conseqüentemente, pode levar a parcial evaporação de alguns constituintes do óleo. (HUSSAIN, 2008).

Tabela 21. Comparação dos rendimentos entre os diferentes óleos essenciais de *N. megapotamica* em diferentes épocas do ano.

Época de Coleta	<i>N. m</i> folhas	<i>N. m</i> galhos
Primavera (A)	0,56%	0,042%
Verão (B)	0,38%	0,065%
Outono (C)	0,81%	0,094%
Inverno (D)	0,78%	0,0137%

Tabela 22. Dados físicos dos óleos essenciais de *N. megapotamica*.

Amostra	d	α [0,05; CH ₂ Cl ₂]	η
Nm gal A	0,7809	nd	1,5709
Nm gal B	0,8590	nd	1,5506
Nm gal C	0,8790	+47,1	1,5390
Nm gal D	0,8440	-35,5	1,4876
Nm fol A	0,7600	-39,8	1,5690
Nm fol B	0,8701	-45,9	1,5485
Nm fol C	0,8600	+29,9	1,5443
Nm gal D	0,8790	-41,9	1,4908
Nm fol Bd	0,8901	+23,9	1,4999

d - densidade em g.mL⁻¹, α - rotação ótica e η - índice de refração, nd- não determinado

5.5.4 Determinação dos constituintes do óleo dos galhos e folhas de *N. megapotamica* nos diferentes períodos do ano

Levando em consideração que a análise dos óleos de galhos e folhas da espécie em questão por cromatografia gasosa não indicou uma diferença quantitativa e qualitativa significativa na composição entre as amostras, tornou-se conveniente simplificar as legendas para primavera (A), verão (B) e verão degradado (Bd) outono (C), inverno (D). As **Figuras 53, 54, 56, 57 e 58** ilustram respectivamente, o perfil cromatográfico das amostras durante os períodos e suas respectivas constituições químicas encontram-se na **Tabela 23**. A numeração dos constituintes apresentada nos cromatogramas corresponde à numeração dos mesmos na **Tabela 23**.

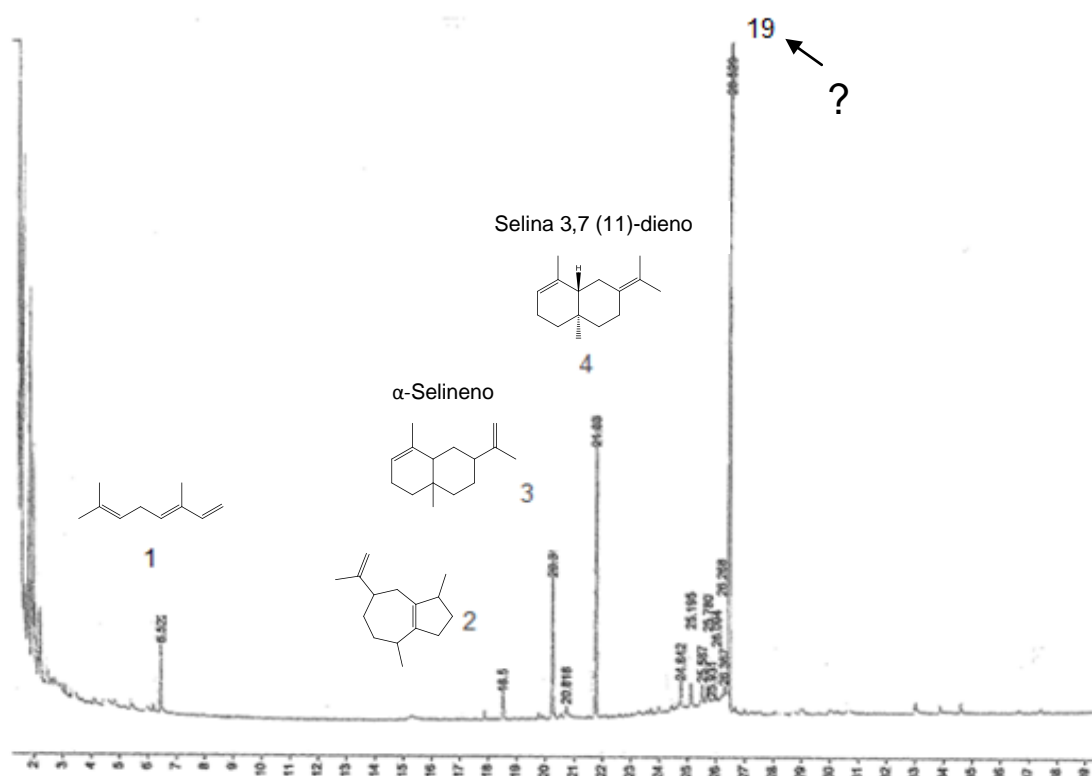


Figura 53. Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de *N. megapotamica*, coletada no primavera (A). A coluna utilizada é a DB5, CCSF de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50 °C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4 °C min⁻¹, aparelho 3400.

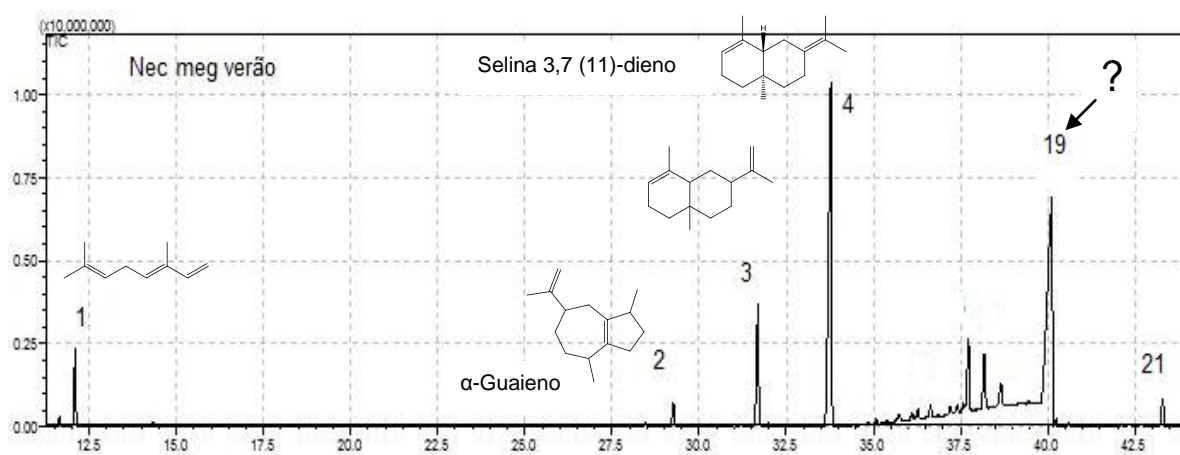


Figura 54. Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de *N. megapotamica*, coletada no verão (B). A coluna utilizada é a 5MS, CCSF de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50 °C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4 °C min⁻¹.

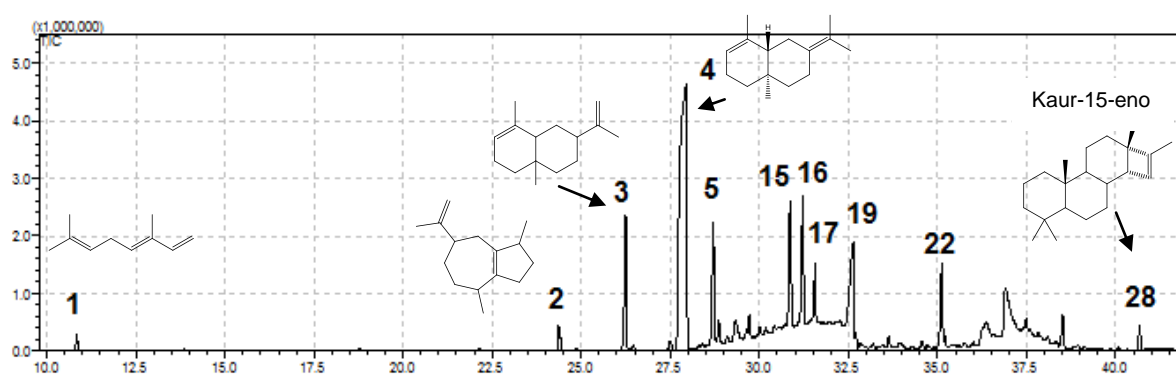


Figura 55. Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de *N. megapotamica*, coletada no verão e reanalisada um ano e dois meses depois para verificação de degradação (Bd). A coluna utilizada é a 5MS, CCSF de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50 °C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4 °C min⁻¹, aparelho 3400.

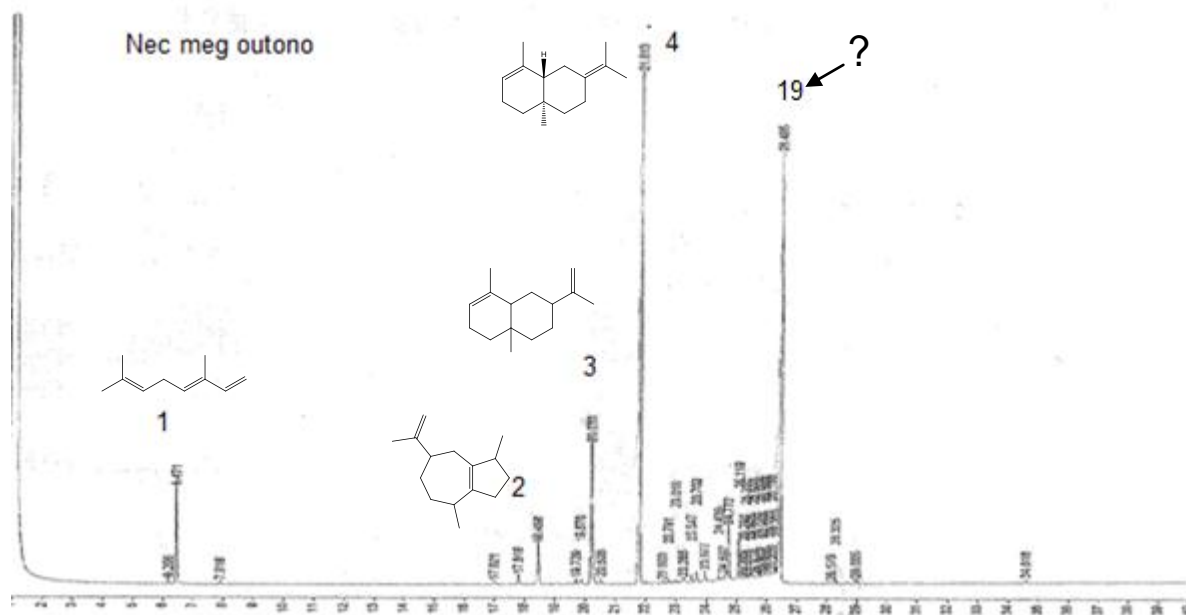


Figura 56. Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de *N. megapotamica*, coletada no outono (C). A coluna utilizada é a DB5, CCSF de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50 °C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4 °C min⁻¹, aparelho 3400.

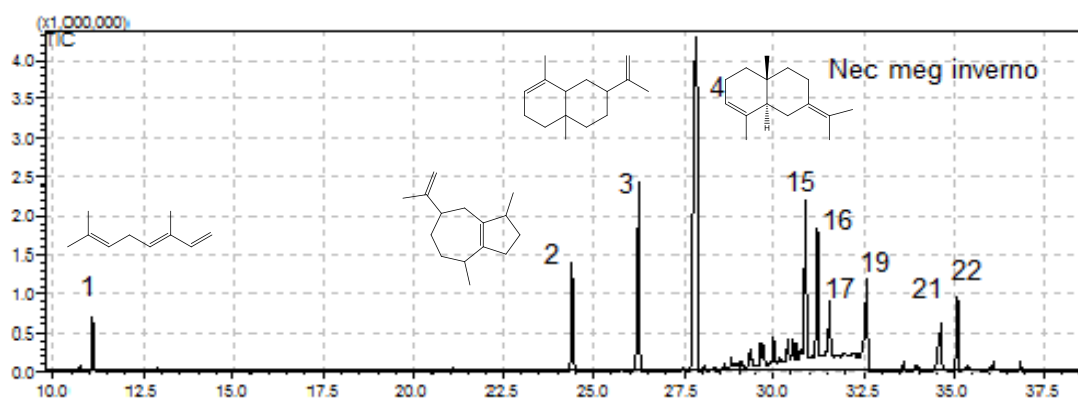


Figura 57. Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de *N. megapotamica*, coletada no inverno (D). A coluna utilizada é a 5MS, CCSF de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50 °C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4 °C min⁻¹.

Tabela 23. Variação da composição dos óleos voláteis das folhas de *N. megapotamica*

Nu	Compon. ^a	IK ^b	IK ^c	A (%)	B (%)	Bd (%)	C (%)	D (%)	Identific.
1	β-Ocimeno	1045	1037	4,75	4,22	1,29	3,94	2,31	CG-EM
2	α-Guaieno	1432	1410	1,93	1,4	6,32	2,63	5,86	CG-EM
3	α-Selineno	1489	1498	8,78	8,84	0,54	8,83	10,53	CG-EM
4	Selina-3,7(11)-dieno	1542	-	17,74	32,41	40,9	34,13	37,35	CG-EM
5	Espatuleno	1586	1578	-	0,59	5,98	-	0,66	CG-EM
6	NI	1602	-	0,36	-	1,02	-	0,49	CG-EM
7	NI	1608	-	-	-	1,6	0,43	0,46	CG-EM
8	NI	1618	-	0,22	0,34	0,52	0,87	1,34	CG-EM
9	NI	1620	-	-	-	0,93	0,45	1,17	CG-EM
10	NI	1624	-	-	1,23	-	0,76	0,89	CG-EM
11	NI	1630	-	0,21	-	-	0,54	1,16	CG-EM
12	NI	1637	-	-	-	-	0,34	1,05	CG-EM
13	NI	1638	-	-	-	-	0,33	1,07	CG-EM
14	Epi α-cadinol	1640	1640	1,11	4,89	-	4,48	0,57	CG-EM
15	NI	1644	-	1,93	3,86	5,95	2,87	8,5	CG-EM
16	NI	1657	-	2,25	1,25	5,92	2,21	6,42	CG-EM
17	NI	1670	-	-	-	2,24	-	2,28	CG-EM
18	NI	1699	-	-	-	-	1,14	-	CG-EM
19	Mistura de PF1 e PF2	1705	-	65,05	38,53	8,63	34,39	7,31	CG-EM, RMN
20	NI	1754	-	-	-	0,48	-	0,33	CG-EM
21	NI	1814	-	-	2,01	-	-	4,4	CG-EM
22	NI	1856	-	-	-	4,29	-	3,74	CG-EM
23	NI	1867	-	-	-	0,97	-	0,47	CG-EM
24	NI	-	-	-	-	1,86	-	-	CG-EM
25	NI	-	-	-	-	6,44	-	-	CG-EM
26	NI	-	-	-	-	0,48	-	-	CG-EM
27	NI	-	-	-	-	1,56	-	-	CG-EM
28	Kaur-15-eno	1987	1998	-	-	1,08	-	-	CG-EM
Total				99,04	99,57	99	98,34	98,36	

^a Componentes listados em ordem de eluição na coluna DB5; ^b Índice de Kovats na coluna DB5; ^c Índice de Kovats da literatura; NI: não identificado; A: amostras coletadas na primavera, B: amostras coletadas no verão, Bd: amostras coletadas no verão e reavaliada, C: amostra coletada no outono, D: amostra coletada no inverno

Através da **Tabela 24** que exibe a composição química dos óleos voláteis desta espécie, observa-se que os óleos das amostras **A**, **B** e **C** apresentam como constituintes principais uma mistura de dois constituinte (inseparáveis por CG), denominados de **PF1** e **PF2**. Esta mistura está mais concentrada no óleo coletado na primavera, diminuindo até o inverno, quando sua concentração é a menor. Por outro lado, o componente Selina-3,7(11)-dieno, ao contrário da mistura **PF1** e **PF2**, aumenta de rendimento no inverno (37, 35%).

Em relação a estudos de composição química dos óleos voláteis desta espécie, foram encontrados na literatura principalmente estudos realizados no estado de São Paulo. O estudo de Romoff et al, (2010) apresentou um total de dezenove componentes identificados, sendo o seu componente majoritário o α -bisabolol (62.3–69.4%). Em outro estudo com a sinonímia *N. saligna* Nees os resultados mostram que existe variação na composição química de indivíduos coletados em regiões diferentes. O indivíduo coletado em Presidente Venceslau apresentou como constituintes majoritários δ -elemeno e seicheleno enquanto o indivíduo de Presidente Prudente apresentou *trans*-cariofileno, biciclogermacreno e germacreno D como majoritários. (MELO, 2003). Como pode ser constatado na **Tabela 24**, nenhum destes terpenos mencionados nestes dois trabalhos foi identificado no presente estudo.

Nos relatos de Brito, 2009 existe variação na composição do óleo essencial de folhas de indivíduos coletados na região do Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI)-SP. Foram coletados três indivíduos nesta mesma região, dois indivíduos apresentaram como constituinte majoritário α -santaleno (15,61 a 17,42%), enquanto a coleta do terceiro indivíduo apresentou o majoritário muuro-la-4,10(14)-dien-1- β -ol (23,09%) e este não possuía α -santaleno na sua composição. Mais uma vez nenhum dos terpenos majoritários presentes no estudo de Brito, 2009 é parte integrante dos óleos analisados no presente trabalho.

A análise do óleo degradado (Bd) demonstra um aumento da quantidade de espatulenol (5,98%) e um decréscimo de α -selineno (0,54%) presentes na amostra quando esta é comparada aos demais óleos. Ao mesmo tempo em que se verifica a presença de terpenos com tempos de retenção superiores, presentes apenas neste óleo, caso do componente Kaur-15-eno (**Tabela 24**).

Além disso, é constatada a diminuição da mistura de PF1/PF2 (8, 63%) e um aumento significativo no composto Selina-3,7(11)-dieno (40,9%), quando esta

amostra é comparada aos óleos **A**, **B** e **C**. Proporções semelhantes a estas encontradas no óleo **Bd** somente são observadas no óleo do inverno (**D**).

Esta inversão de porcentagens pode ser um indício de degradação, assim como pode estar relacionada a um mecanismo de estabilização presente naturalmente na planta. A rota biossintética de modificação estrutural de PF1 e PF2 até moléculas de Selina-3,7(11)-dieno, poderia ser proposta como o caminho inverso do descrito no **item 5.5.7**. É importante ressaltar a grande semelhança estrutural entre os sesquiterpenos Selina-3,7(11)-dieno (**Terpeno 4**) e α -Selineno (**Terpeno 3**), diferenciados apenas pela posição da dupla ligação na cadeia lateral do anel eudesmânico (**Figura 53 a 57**).

5.5.5 Análise do Isolamento dos componentes majoritários do óleo das folhas de *N. megapotamica*

Embora o componente de número **19 (Figura 53 a 57)** no cromatograma sugerisse apenas um componente, o óleo foi submetido a uma separação por CC (**Item 4.10 da parte experimental**) na tentativa de isolar o componente **19 (Tabela 23)**. Deste processo, obteve-se uma fração, codificada como **NmFr3**, que submetida a CG (**Figura 58**) continha 70% do pico majoritário. A partir deste resultado, esta fração **NmFr3** foi submetida a análise por ressonância magnética nuclear de ^{13}C (**Figura 59**). A análise destes espectros mostrou que na realidade o que parecia apenas um componente por CG, tratava-se de uma mistura de dois componentes de estruturas muito similares

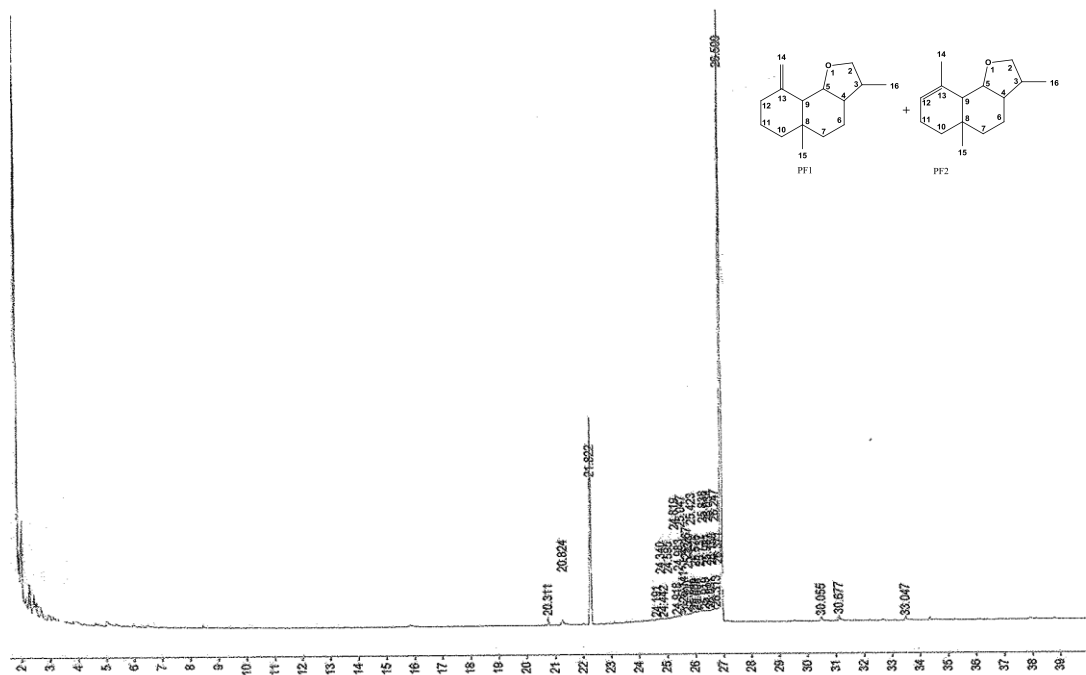


Figura 58. Perfil cromatográfico de NmFr3 retirada do óleo essencial das folhas de *N. megapotamica*. A coluna utilizada é a DB5, CCSF de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50 °C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4 °C min⁻¹, aparelho 3400.

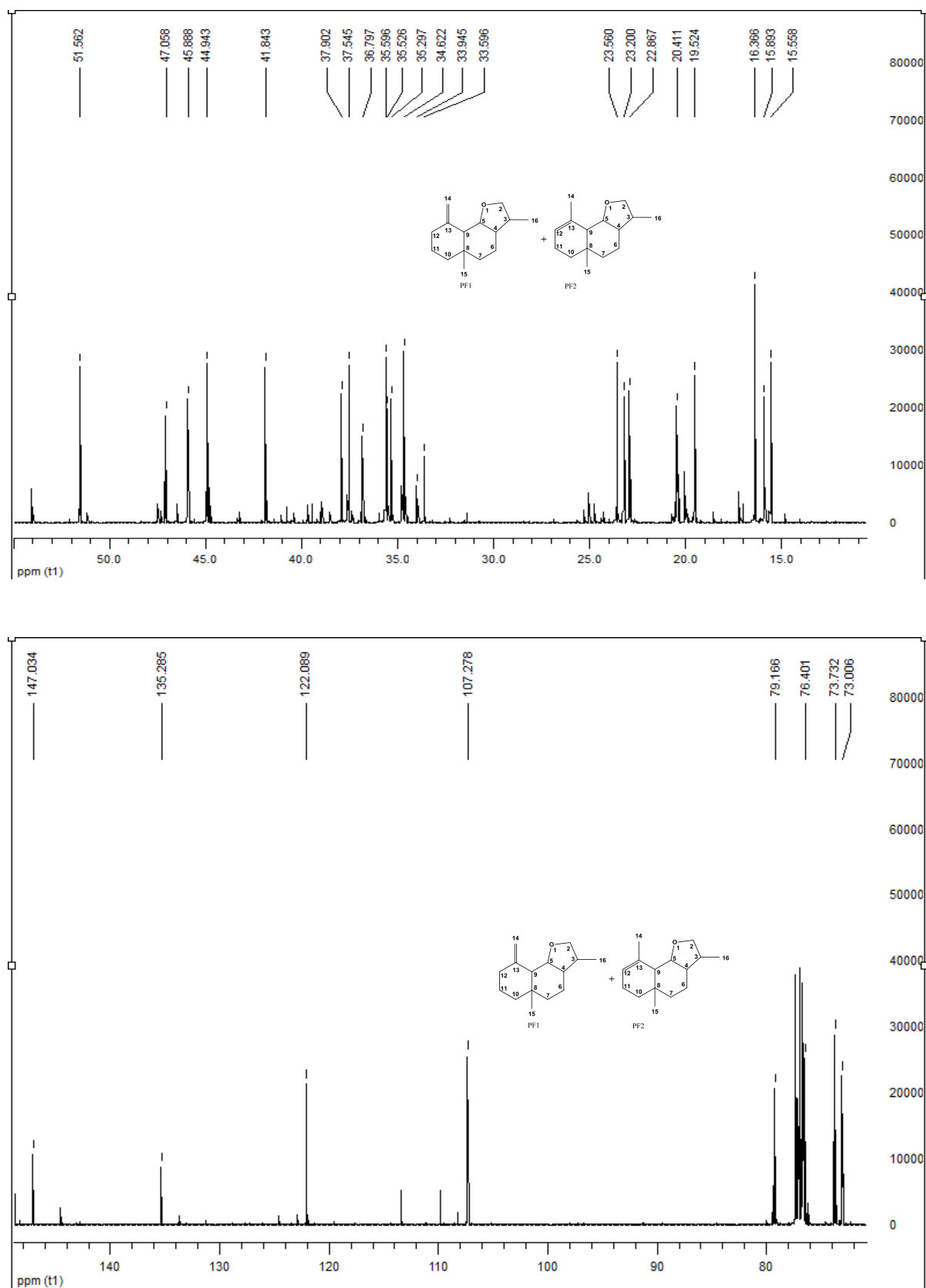


Figura 59. Espectro de RMN ^{13}C a 400 MHz em CDCl_3 de NmFr3 da coluna de isolamento do componente majoritário de *N. megapotamica*

5.5.5.1 Separação dos dois compostos majoritários do óleo das folhas de *Nectandra megapotamica* contidos em **NmFr3**.

Devido o insucesso de se isolar os componentes por CC, e pela presença no espectro de RMN de um sinal de carbono próximo de 80 ppm, característico de carbono carbinólico, objetivou-se uma reação de derivatização deste possível álcool, na forma de seu derivado acetila. A tentativa inicial com anidrido acético não teve sucesso. Em uma segunda tentativa, utilizou-se o anidrido trifluoracético, desta forma, após a reação trabalhada, obtiveram-se dois compostos separáveis por CG e CCD (**Figura 60**). Após a purificação por CCDP obteve-se dois compostos codificados como **PF1** e **PF2**. O composto **PF1** foi analisado por CG (**Figura 61**) apresentando 98% de pureza. O composto **PF2** também foi analisado por CG (**Figura 62**) apresentando 92% de pureza.

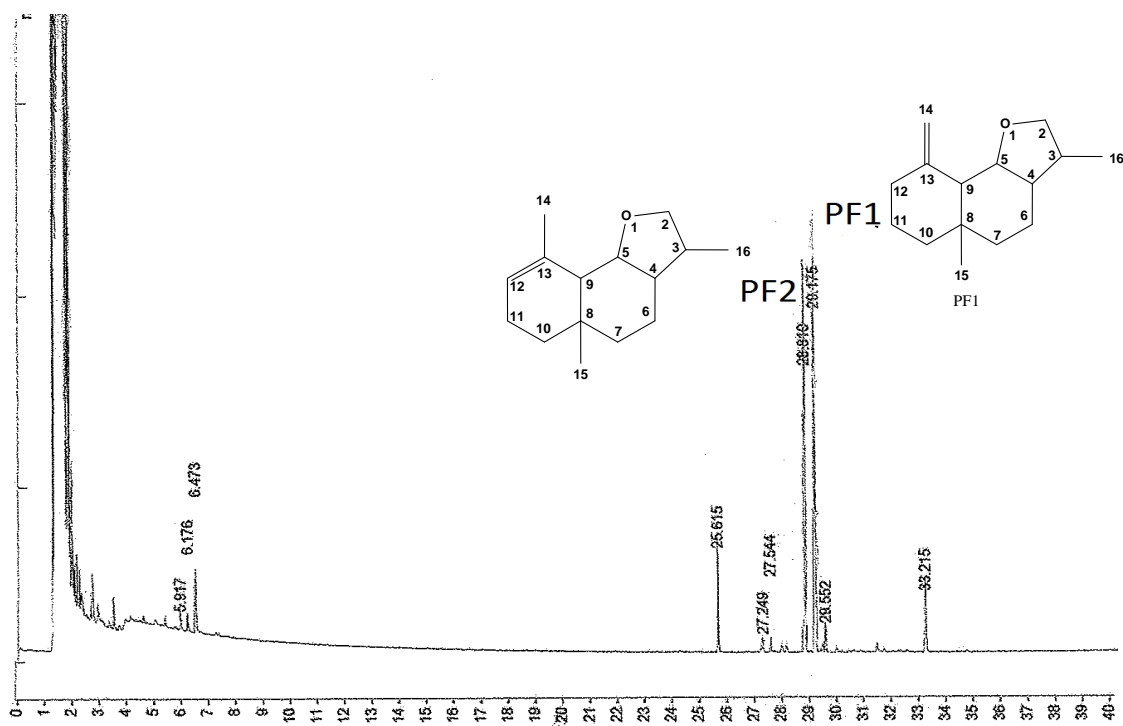


Figura 60. Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de *N. megapotamica*, após reação de acetilação. A coluna utilizada é a DB5, CCSF de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50°C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4 °C min⁻¹, aparelho CP3800.

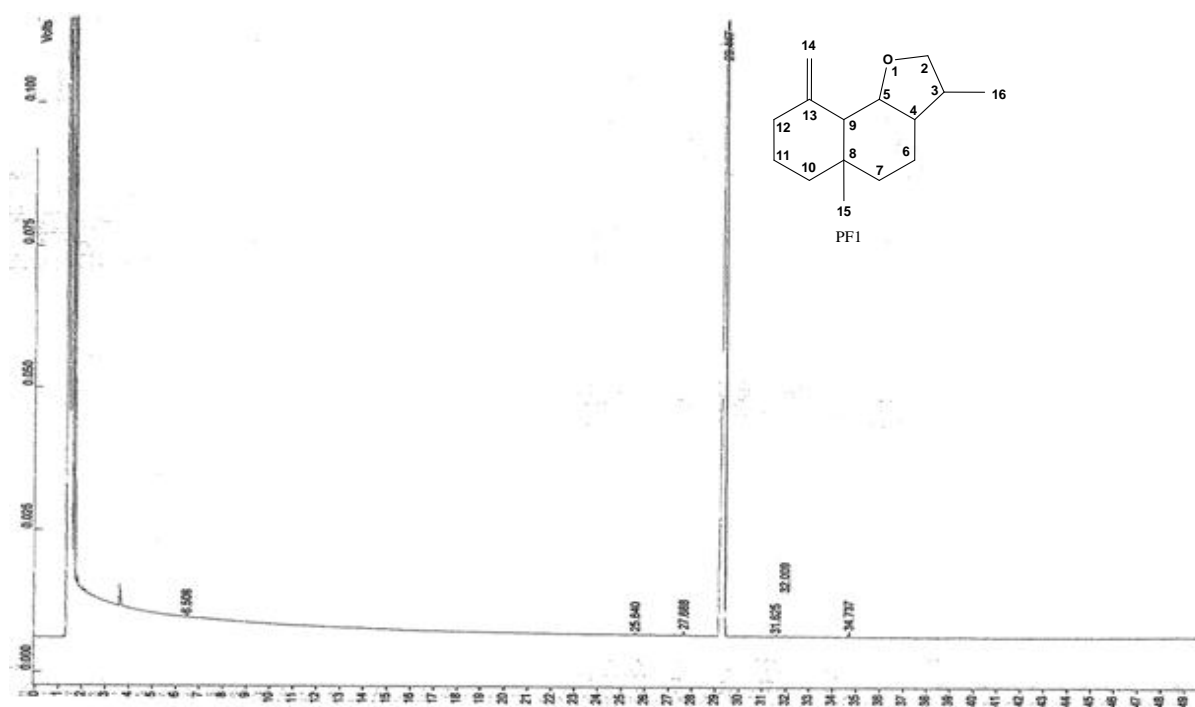


Figura 61. Perfil cromatográfico do terpeno isolado (PF1) das folhas de *N. megapotamica* após a reação de acetilação. A coluna utilizada é a DB5, CCSF de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50°C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4°C min⁻¹.

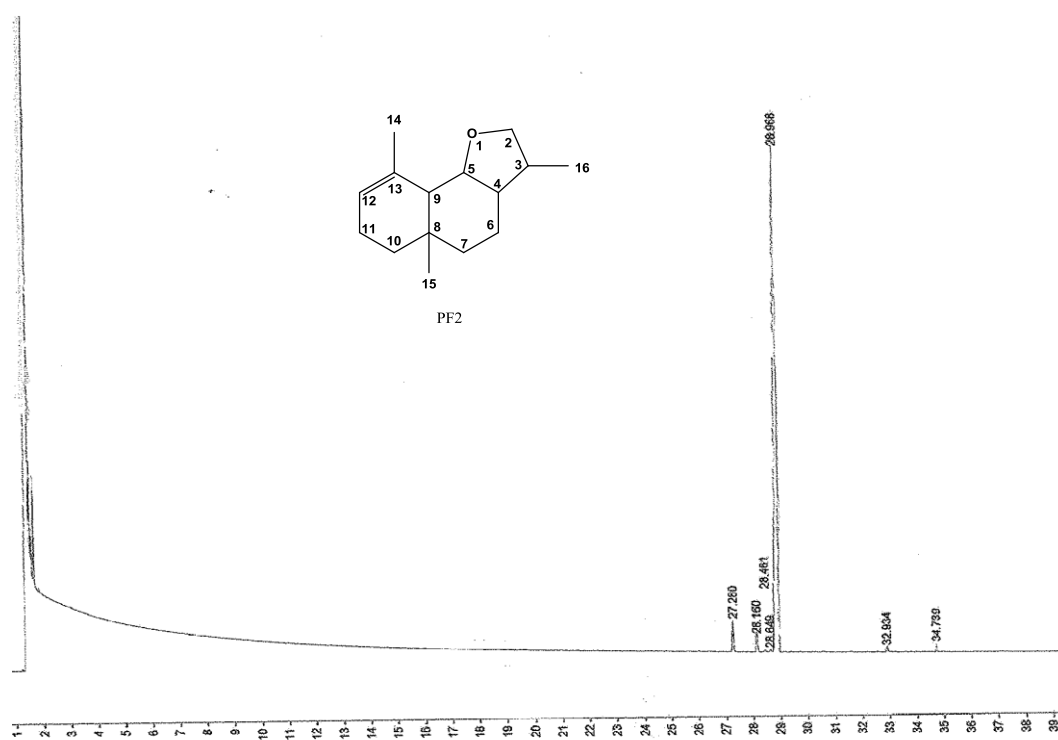


Figura 62 Perfil cromatográfico do terpeno isolado (PF2) das folhas de *N. megapotamica* após a reação de acetilação. A coluna utilizada é a DB5, CCSF de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50 °C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4 °C min⁻¹.

5.5.5.1.1 Determinação estrutural do majoritário PF1

O composto codificado **PF1**, obtido de forma pura após tratamento do óleo essencial das folhas de *N. megapotamica* por CCDP, teve sua estrutura elucidada através da combinação de métodos como a espectrometria de massas e de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , uni e bidimensionais. Trata-se de um composto opticamente ativo, pois apresenta um $[\alpha]^{25}_D$: - 33 (em CHCl_3 , $c = 0,002$). Após as análises, o composto foi definido como um novo sesquiterpeno.

O espectro de massas (EI) de **PF1** (**Figura 63**) mostrou um íon molecular ($\text{M}^{\bullet+}$) a m/z 220, correspondendo a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$, o que foi posteriormente confirmado pela interpretação dos espectros de RMN.

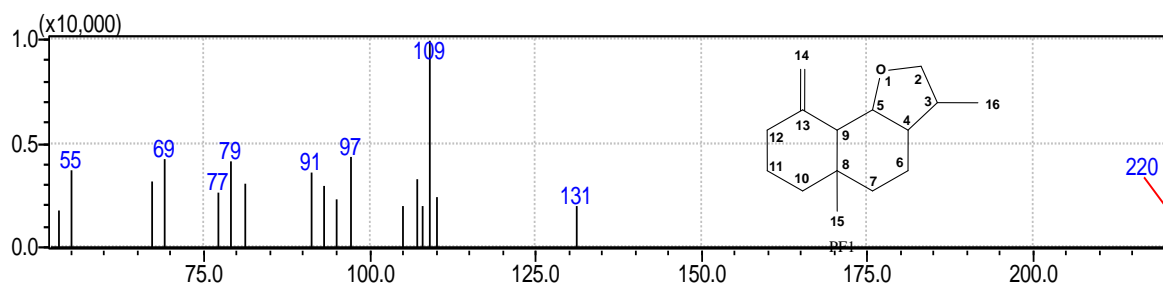


Figura 63. Espectro de massas do sesquiterpeno PF1 isolado do óleo de *N.megapotamica*.

O espectro de RMN ^1H deste composto (**Figura 64**) mostra dois grupos metílicos alifáticos, que absorvem a δ 0,73, 0,99 ppm como um singlete e um dubleto respectivamente. Também podem ser observados os sinais correspondentes a dois hidrogênios vinílicos diastereotópicos, que absorvem a δ 4,77 e 4,92 ppm como dois tripletos. A atribuição dos demais hidrogênios da estrutura foi possível pela análise de espectros bidimensionais, como HETCOR, COLOC e COSY.

A atribuição de sinais de RMN ^{13}C dos núcleos de carbono foi realizada através de técnicas de ressonância magnética nuclear de carbono totalmente desacoplado e DEPT e de espectros bidimensionais.

A proposta estrutural numerada para PF1 é apresentada na **Figura 65** e a os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C de PF1 estão apresentados na **Tabela 25**.

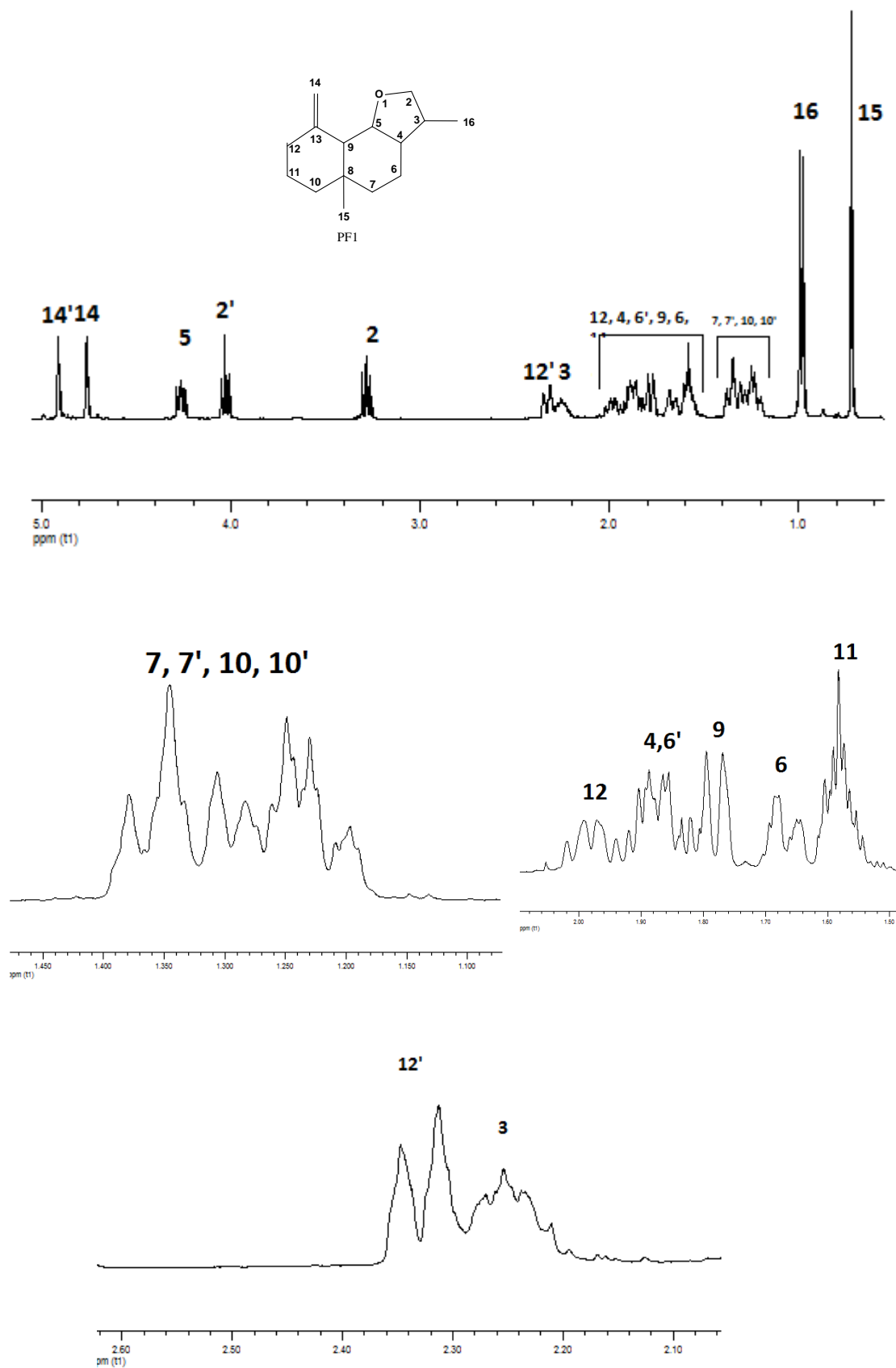


Figura 64. Espectro e expansões do RMN de ^1H a 400 MHz em CDCl_3 , do sesquiterpene PF1.

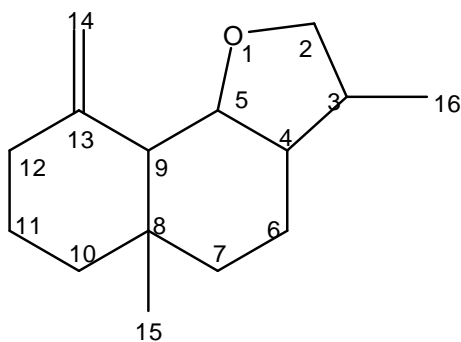


Figura 65. Proposta estrutural do sesquiterpeno PF1.

O espectro de RMN de carbonos mostra que a estrutura deste componente apresenta 15 carbonos na região entre δ 15,589 e δ 147,088 ppm (**Figura 65 e 66**), portanto caracterizando um sesquiterpeno. Além disso, a estrutura é composta por dois carbonos olefínicos, em 147,0 ppm e em 107,2 ppm.

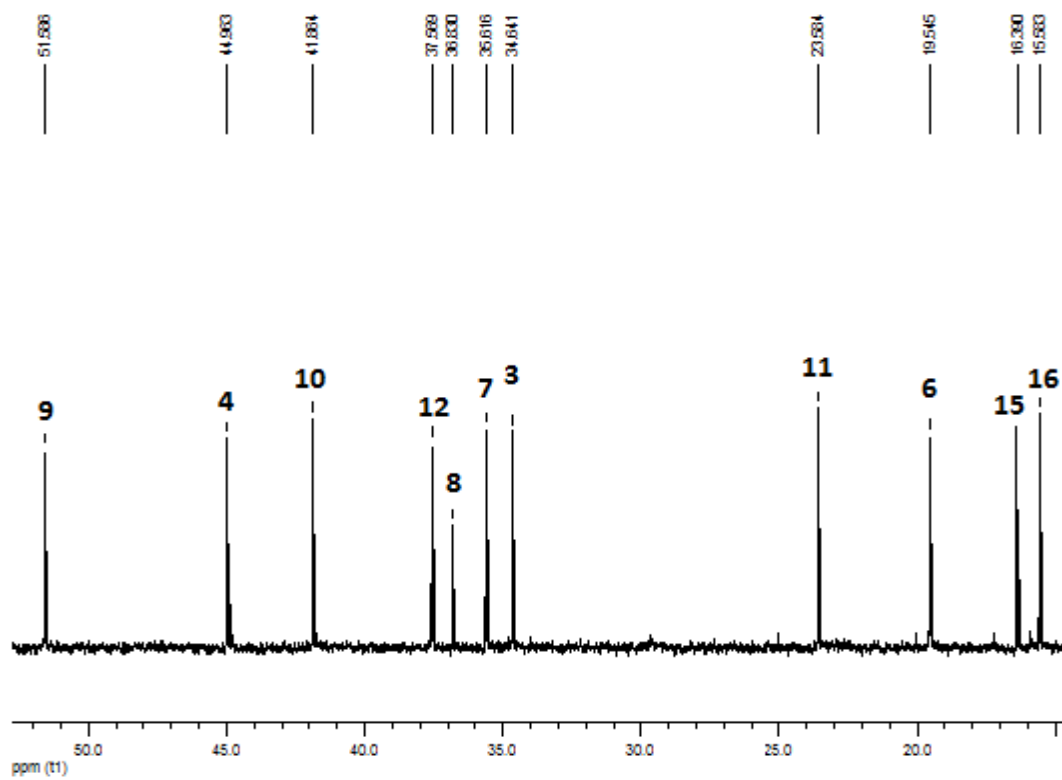
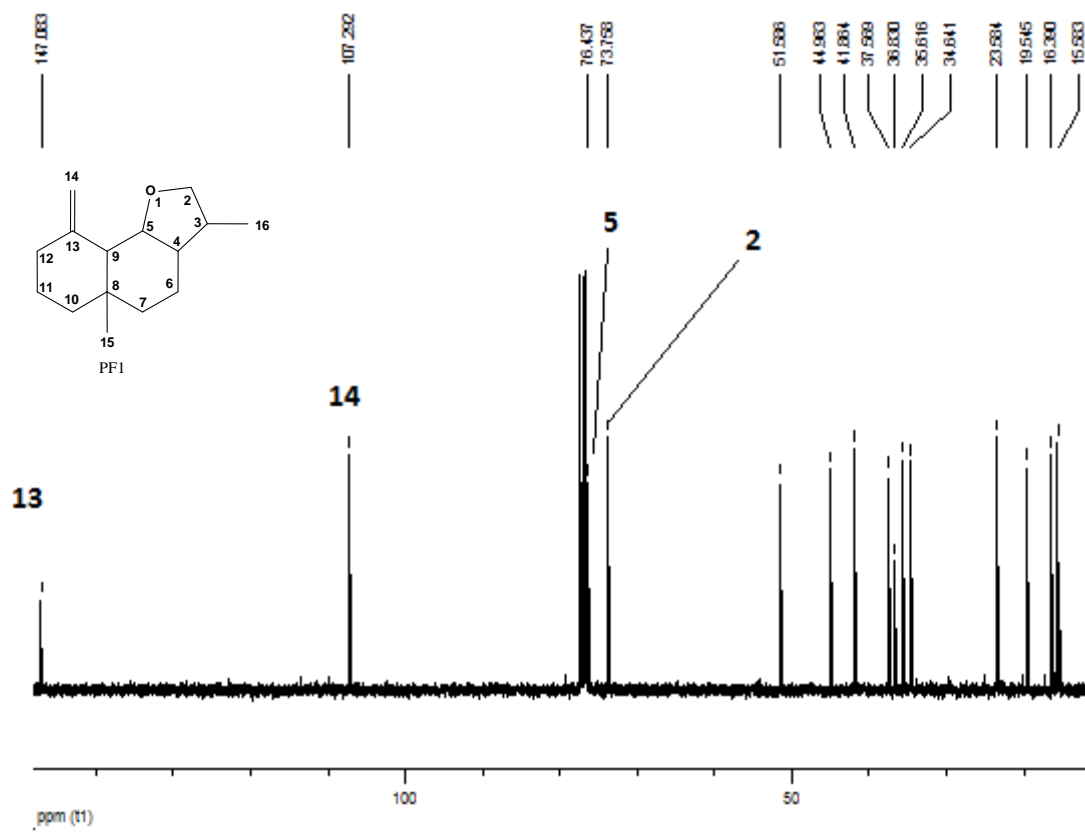


Figura 66. Espectro de RMN de ^{13}C a 400 MHz em CDCl_3 , do sesquiterpene PF1.

O espectro DEPT 135 (**Figura 67**) mostra que o primeiro é um carbono desidrogenado e o segundo um CH₂. Na região de carbonos ligados a oxigênio, aparecem dois sinais, um em 76,4 ppm e o outro em 73,7 ppm. O espectro DEPT mostra que o sinal em 73,7 ppm pertence a um grupo metilênico ligado a um álcool. Além disso, a estrutura é composta por mais cinco grupos metilênicos ligados a carbonos sp₃, dois grupos metilas ligadas a carbonos sp₃, três grupos metínicos ligados a carbonos sp₃. O espectro DEPT mostra ainda a ausência de três sinais, correspondentes ao total de carbonos desidrogenados.

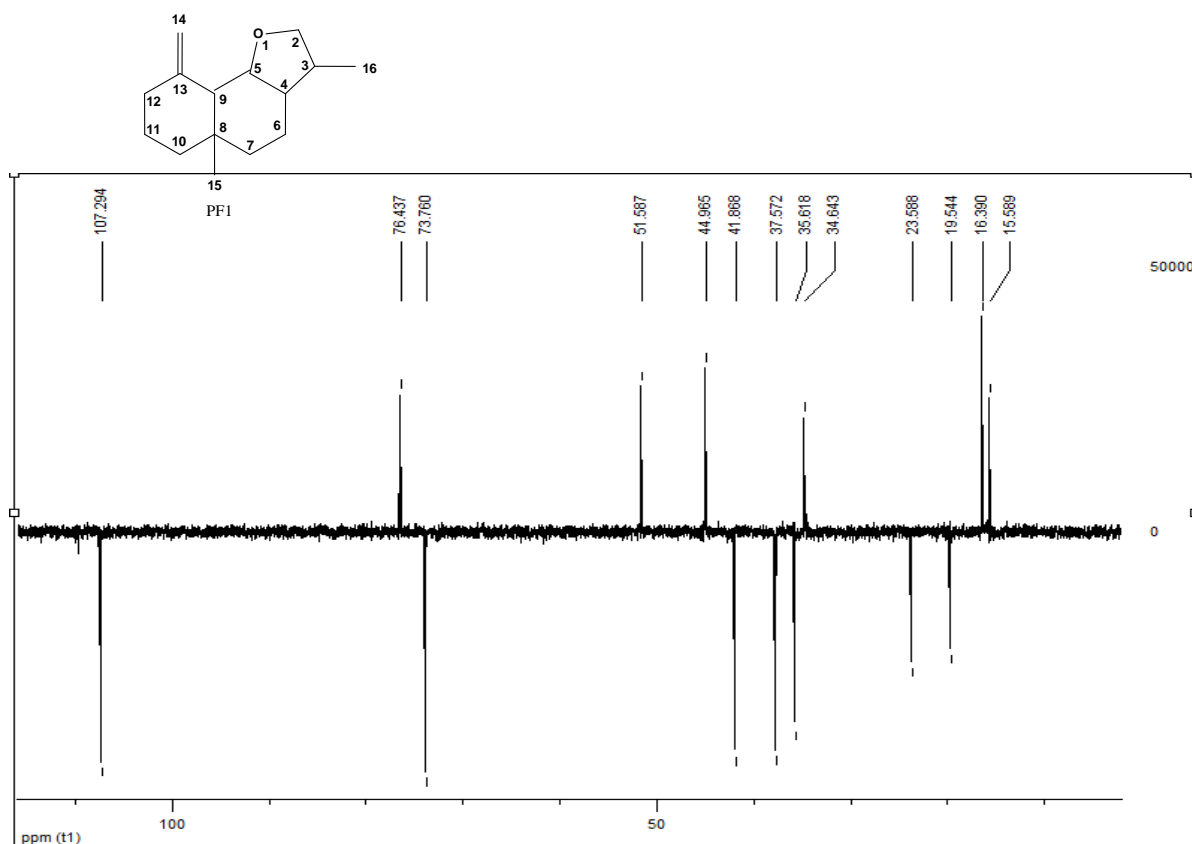


Figura 67 Espectro de RMN de ¹³C DEPT-135 em CDCl₃, do PF1, isolado de *N. megapotamica*.

O espectro HETCOR (não numerado) e suas expansões (numeradas) (**Figuras 68 a 71**) possibilitaram identificar os carbonos protonados, presentes em PF1, através da correlação dos deslocamentos químicos de cada carbono com o respectivo hidrogênio.

Analisando-se o espectro, observa-se a ausência de correlações com os carbonos que absorvem a δ 147,088 e 36,835 ppm, confirmando a presença quaternário de dois carbonos quaternários na estrutura de PF1. No mesmo espectro,

observa-se ainda as correlações entre os hidrogênios diastereotópicos que absorvem a δ 4,04 (H2'), 3,29 (H2), 1,58 (H6), 1,87 (H6'), 1,35 (H7'), 1,385 (H7), 1,20 (H10'), 1,29 (H 10), 2,34 (H12'), 2,00 (H12) ppm e os carbonos que absorvem a δ 73,764; 19,551; 35,622; 41,870; 37,574 ppm, respectivamente.

As ampliações do espectro de HETCOR (**Figura 69 a 70**) mostram claramente que o grupo metilênico ligado ao oxigênio, esta conectado a um centro estereogênico da molécula, e que os hidrogênios do grupo =CH₂ não são equivalentes

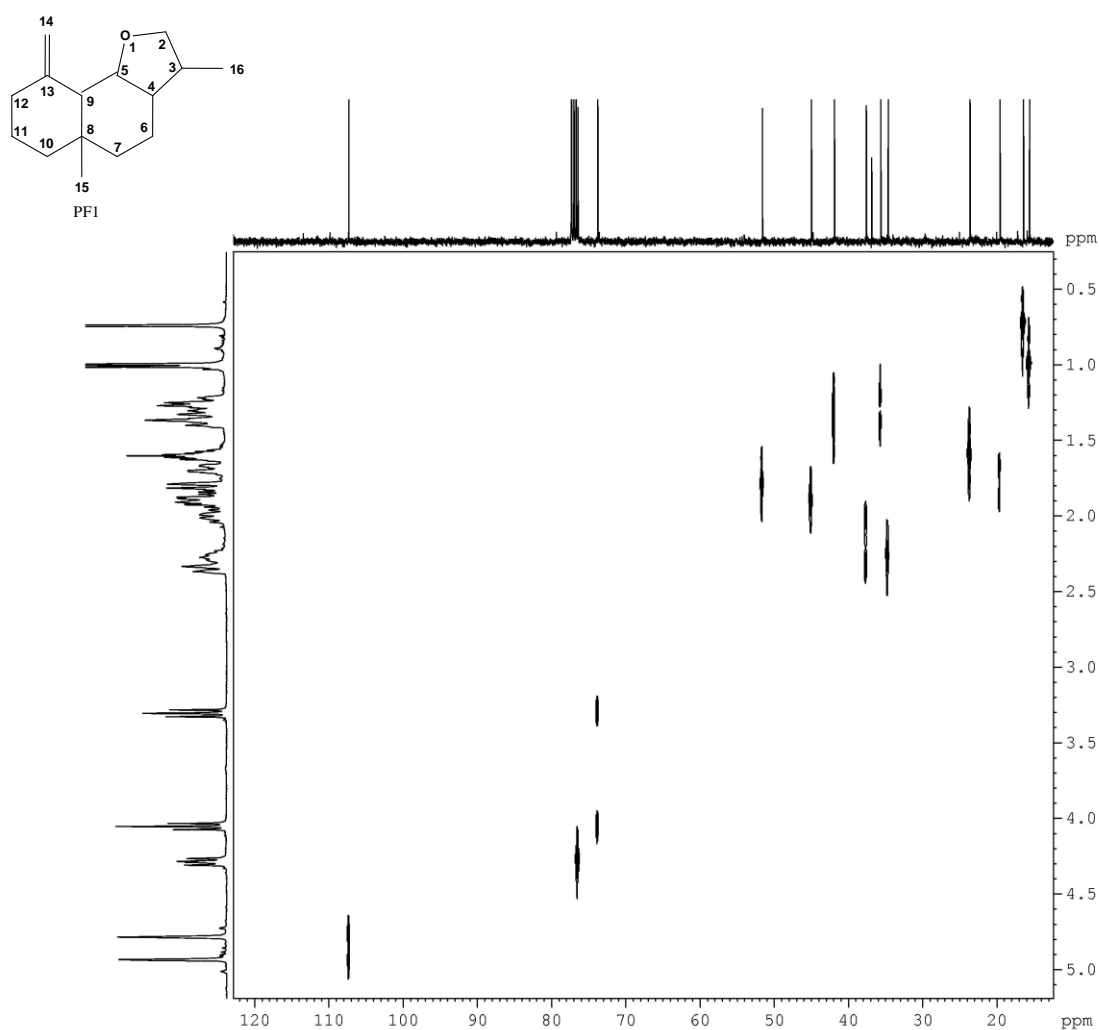


Figura 68. Espectro de HETCOR de PF1, em CDCl₃, a 400 MHz.

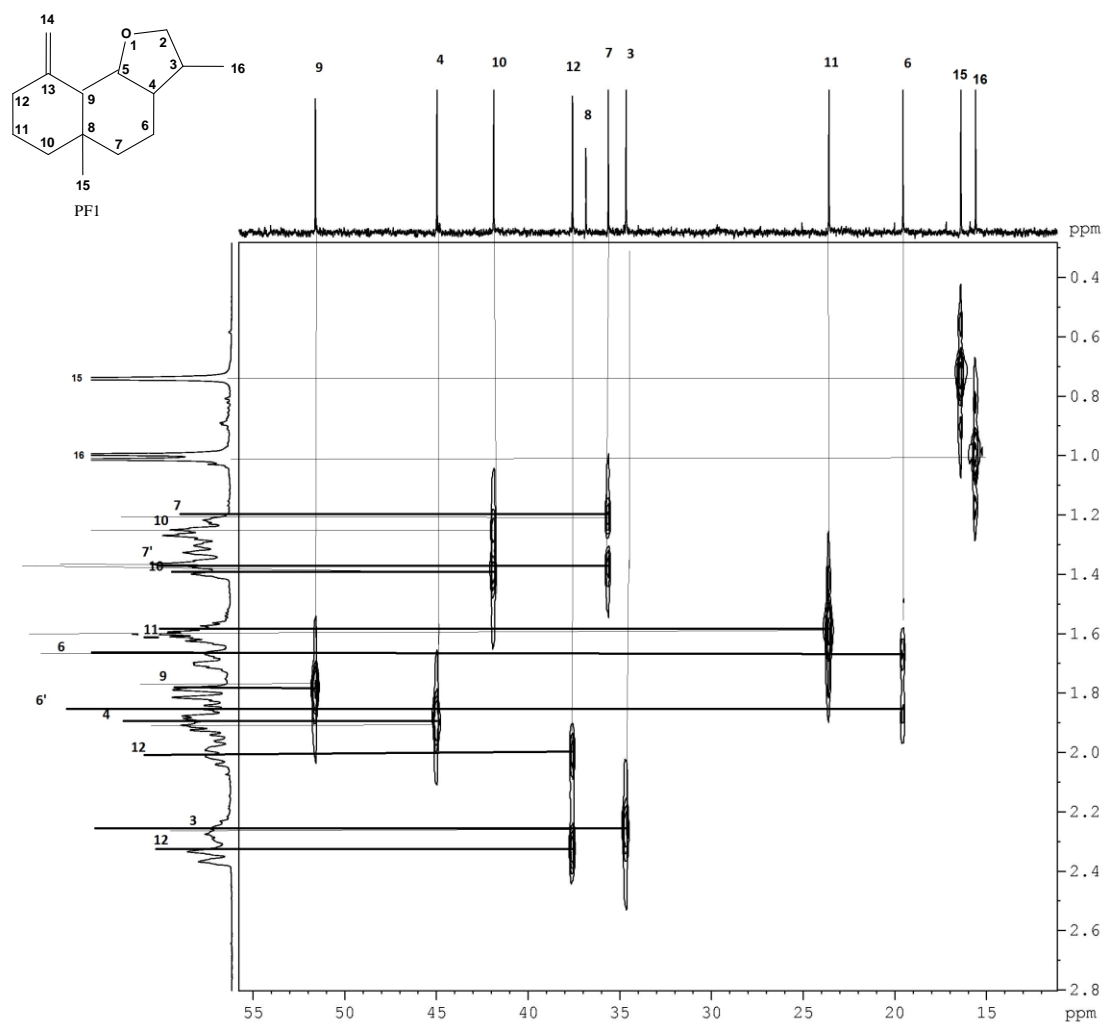


Figura 69. Espansão 1 do espectro de HETCOR de PF1, em CDCl_3 , a 400 MHz.

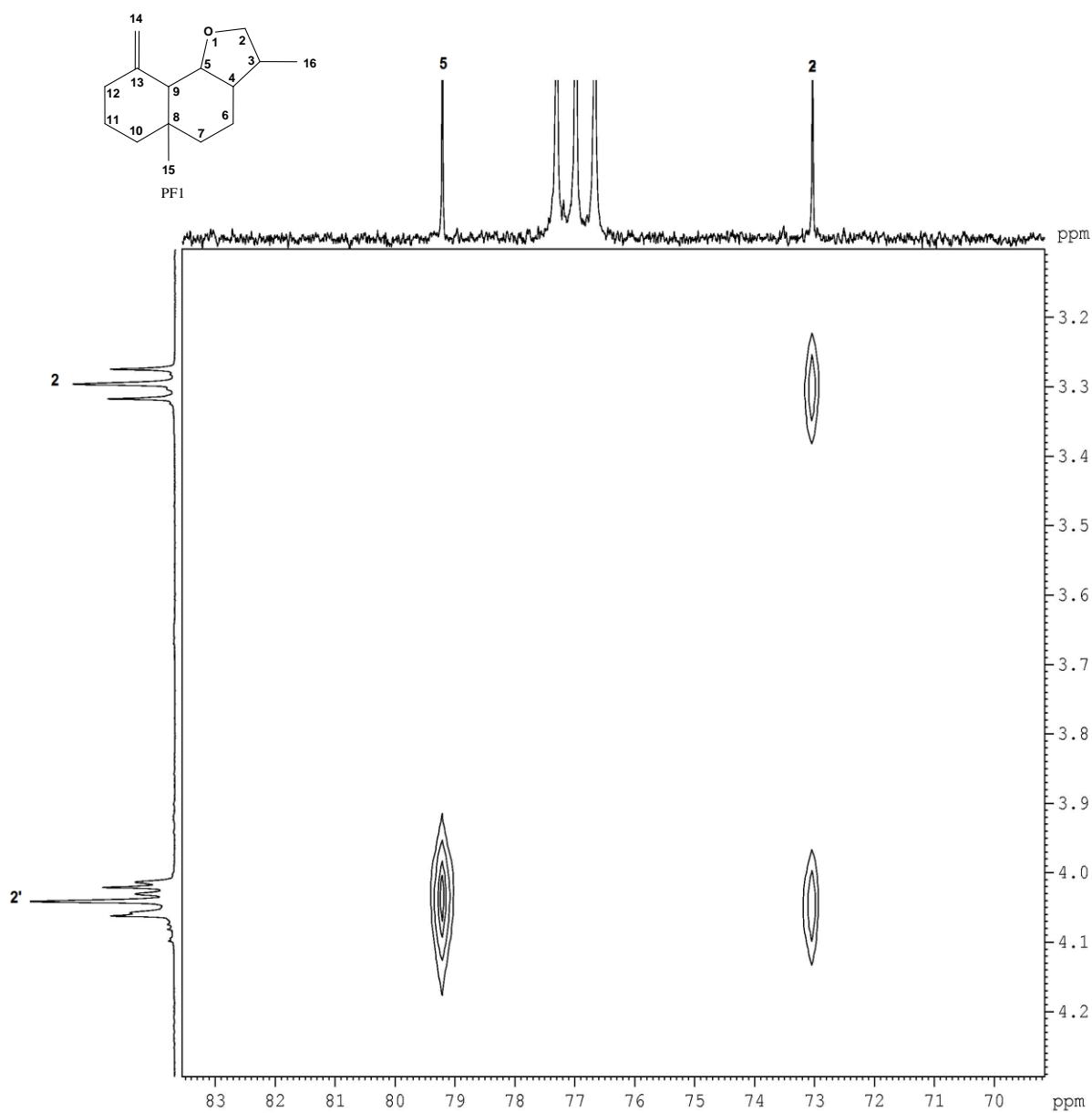


Figura 70. Expansão 2 do Espectro de HETCOR de PF1, em CDCl_3 , a 400 MHz.

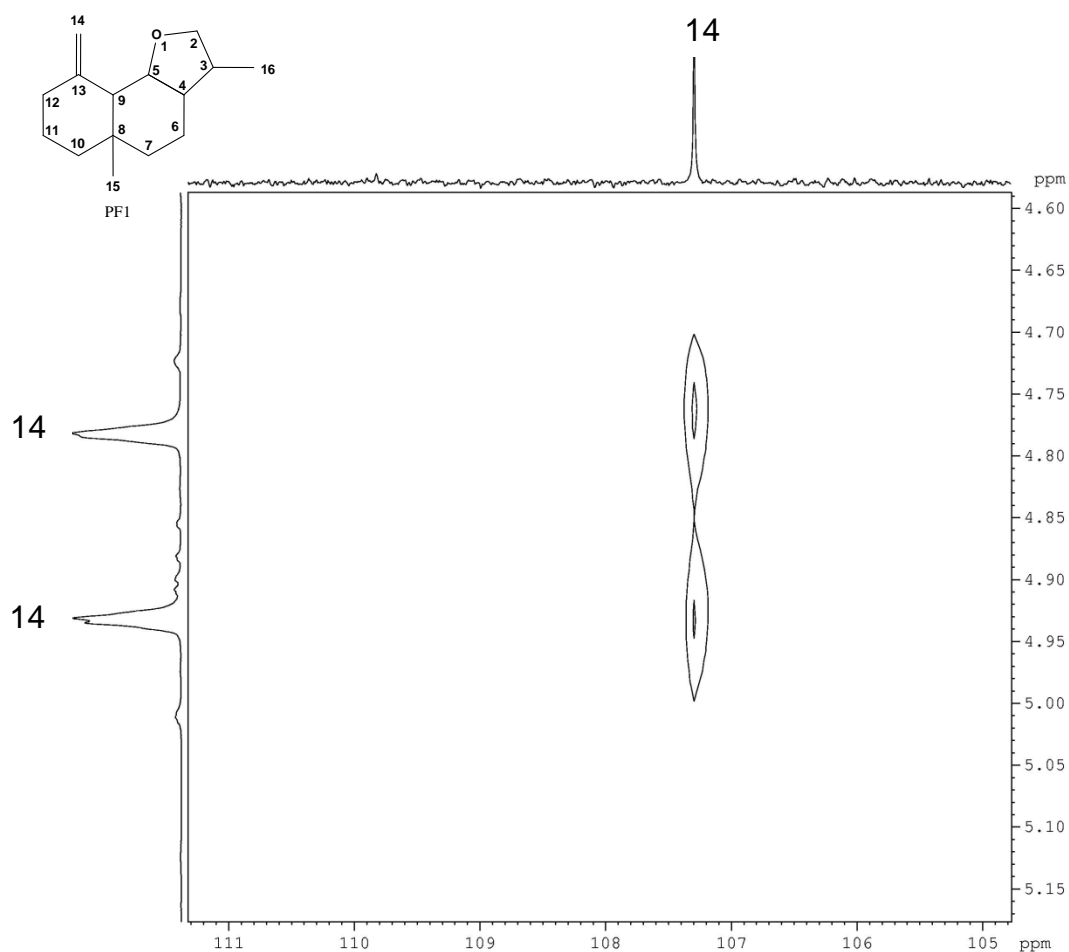


Figura 71. Expansão 3 do Espectro de HETCOR de PF1, em CDCl_3 , a 400 MHz.

Com estes dados, podemos atribuir a presença de uma dupla ligação, e através da fórmula molecular (EM e RMN de ^{13}C), se sugere uma estrutura com quatro insaturações. Como apenas uma insaturação foi detectada por RMN, as outras três correspondem a sistemas cíclicos. Desta maneira sugere-se que o esqueleto da estrutura seja composto por um sistema tricíclico.

No espectro de COSY de PF1 a seguir (**Figura 72**) observaram-se dois sistemas de spins, O primeiro sistema mostra acoplamento entre H-16 e H-3, entre H-3 e H-2 e H-2', entre H-4 e H-5, entre H5 e H6 e H6', entre H-5 e H-9 (fragmento A), Além disso, foram observados os acoplamentos entre H-10 e H-10' e H-11 e H-11' e H-11 e H-11' e H-12 e H-12', formando o segundo sistema de spins (fragmento B)

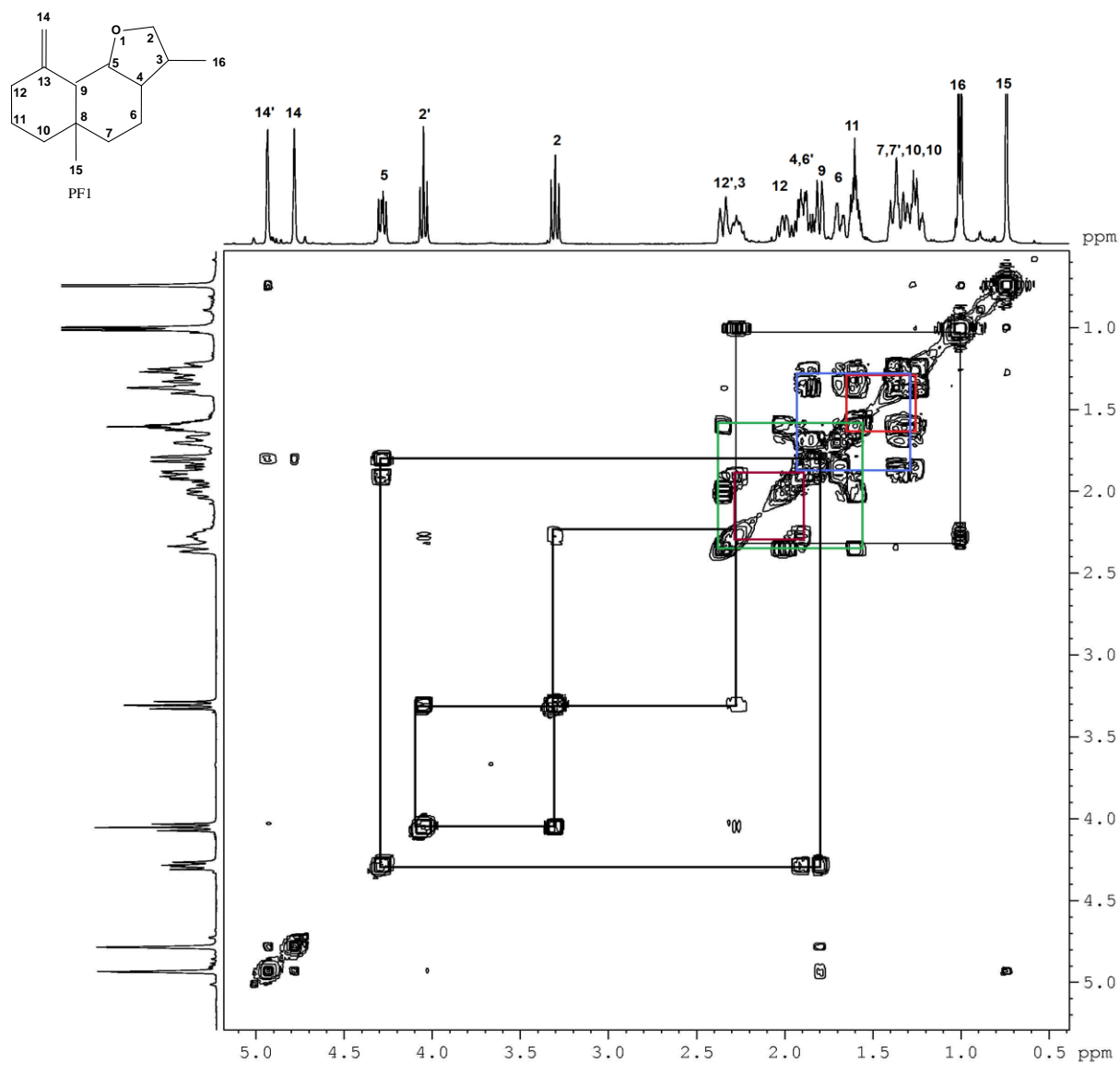


Figura 72. Espectro de COSY de PF1, em CDCl_3 , a 400 MHz,

Tabela 24. Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C de PF1.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)		$\delta^1\text{H}$ (ppm)
2	73,764	CH_2	2': 4,04 (t, 1H, $J=8,1\text{Hz}$) 2: 3,29 (t, 1H, $J=3,5\text{Hz}$)
3	34,647	CH	2,25 (m, 1H)
4	44,969	CH	1,89 (m, 1H)
5	76,442	CH	4,27 (dd, 1H, $J=7,2\text{Hz}$, $J=10,2\text{Hz}$)
6	19,551	CH_2	6 : 1,65 (m, 1H) 6': 1,87 (m, 1H)
7	35,622	CH_2	7: 1,385 (m,1H) 7':1,35 (m, 1H)
8	36,835	C	-
9	51,592	CH	1,79 (d, 1H, $J=10,4\text{Hz}$)
10	41,870	CH_2	10': 1,2 (m, 1H) 10: 1,29 (m, 1H)
11	23,590	CH_2	1,58 (m, 2H)
12	37,574	CH_2	12': 2,34 (m, 1H) 12: 2,00 (m 1H)
13	147,088	C	-
14	107,298	CH_2	14: 4,77 (d, 1H, $J=1,5\text{Hz}$) 14': 4,92 (d, 1H, $J=1,5\text{Hz}$)
15	16,395	CH_3	0,73 (s, 3H)
16	15,589	CH_3	0,99 (d, 3H, $J=6,4\text{Hz}$)

As Figuras 73 a 77 apresentam os espectros de RMN COLOC com as correlações dos deslocamentos químicos dos carbonos com os hidrogênios separados por uma, duas ou três ligações entre si.

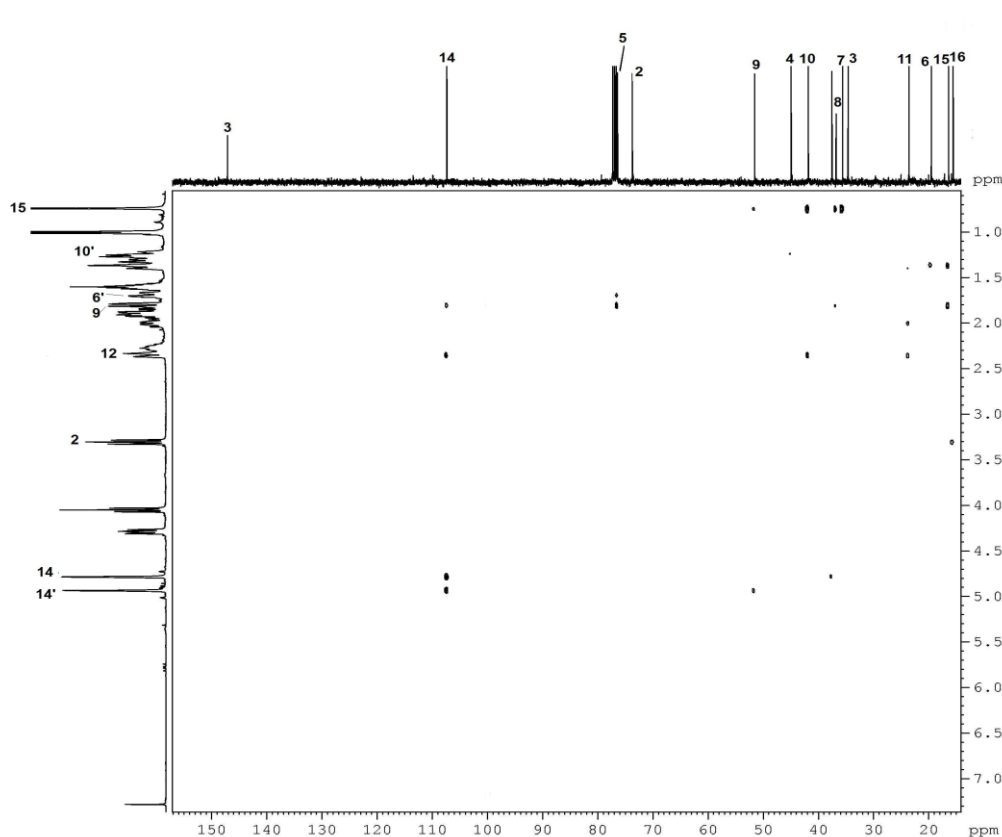


Figura 73. Espectro de COLOC de PF1, em CDCl_3 , a 400 MHz.

Para uma melhor visualização o espectro bidimensional COLOC (**Figura 73**) foi ampliado e apresentado nas **Figuras 74 a 77** assim como as correlações entre os hidrogênios e carbonos estão elencados na **Tabela 25**. Este experimento mostra as correlações entre o hidrogênio H-9 (1,79) e os carbonos C-5 (76,442), C-12 (37,574), C-13 (147,088), C-14 (107,298), C-15 (16,395), bem como a relação entre o H-2 (3,29) e o C-16 (15,589). Correlaciona os hidrogênios H-15 (0,73) com os carbonos C-8 (36,835), C-9 (51,592), C-10 (41,87), C-7 (35,622).

Exibe a correlação entre os hidrogênios diastereotópicos H-6': (1,65) e H-6: (1,87) com os carbonos, C-8 (36,835), C-5 (76,442); H-7 (1,385) e H-7': (1,35) com C-15 (16,395), C-6 (19,551). Assim como os acoplamentos entre os também diastereotópicos H-12' (2,34) e H-12 (2,00) com C-10 (41,87), C-11 (23,59), C-14 (107,298). Este espectro mostra as correlações entre H-14 (14: 4,77) e H-14' (4,92) e os carbonos C-12 (37,574), C-9 (51,592).

Os sinais devidos aos $^1J_{\text{C,H}}$ estão invariavelmente presentes no espectro de COLOC, por esse motivo não foram mencionados neste contexto e na **Tabela 25**.

Todos estes resultados das correlações a longa distância reforçam a proposta estrutural sugerida para a molécula de PF1.

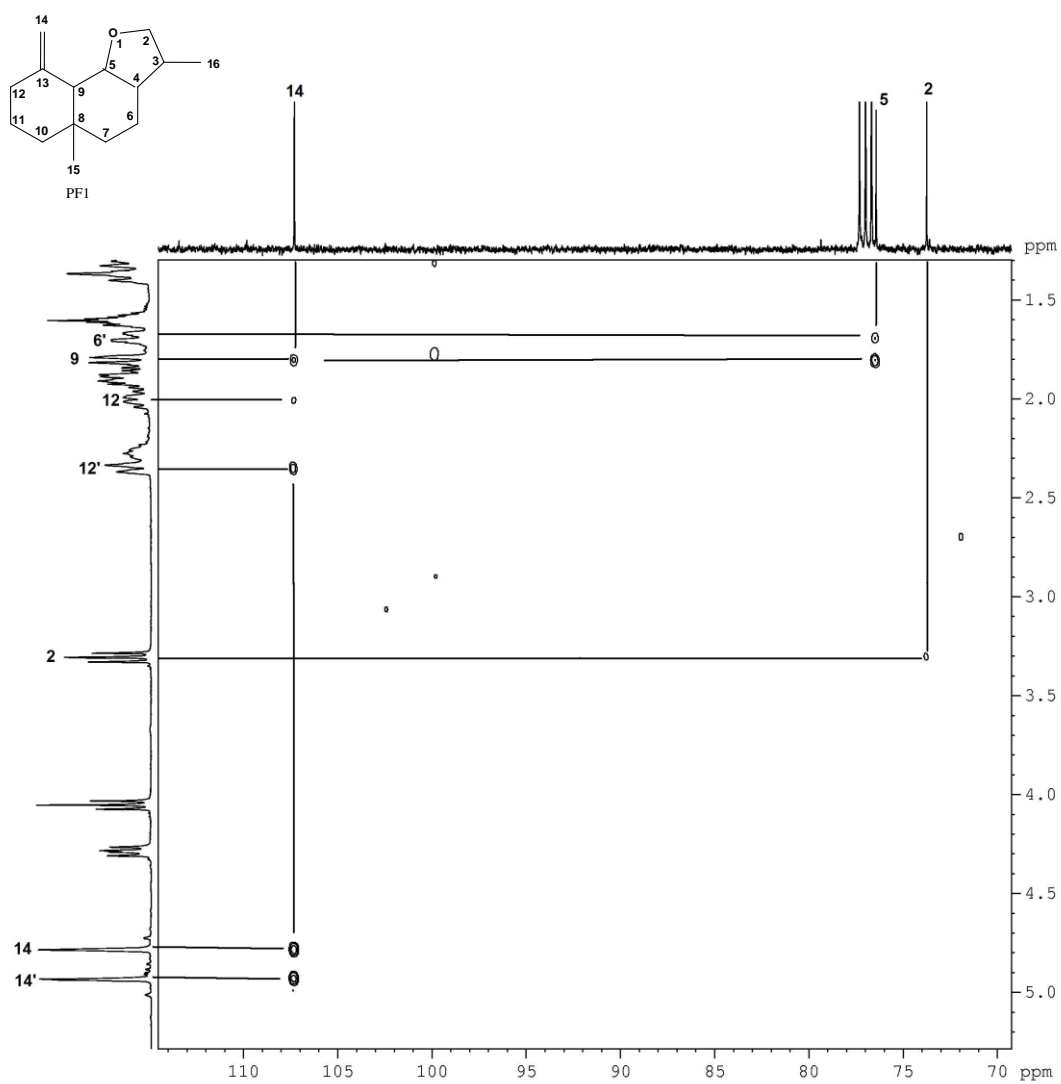


Figura 74. Expansão 1 do Espectro de COLOC de PF1, em CDCl_3 , a 400 MHz.

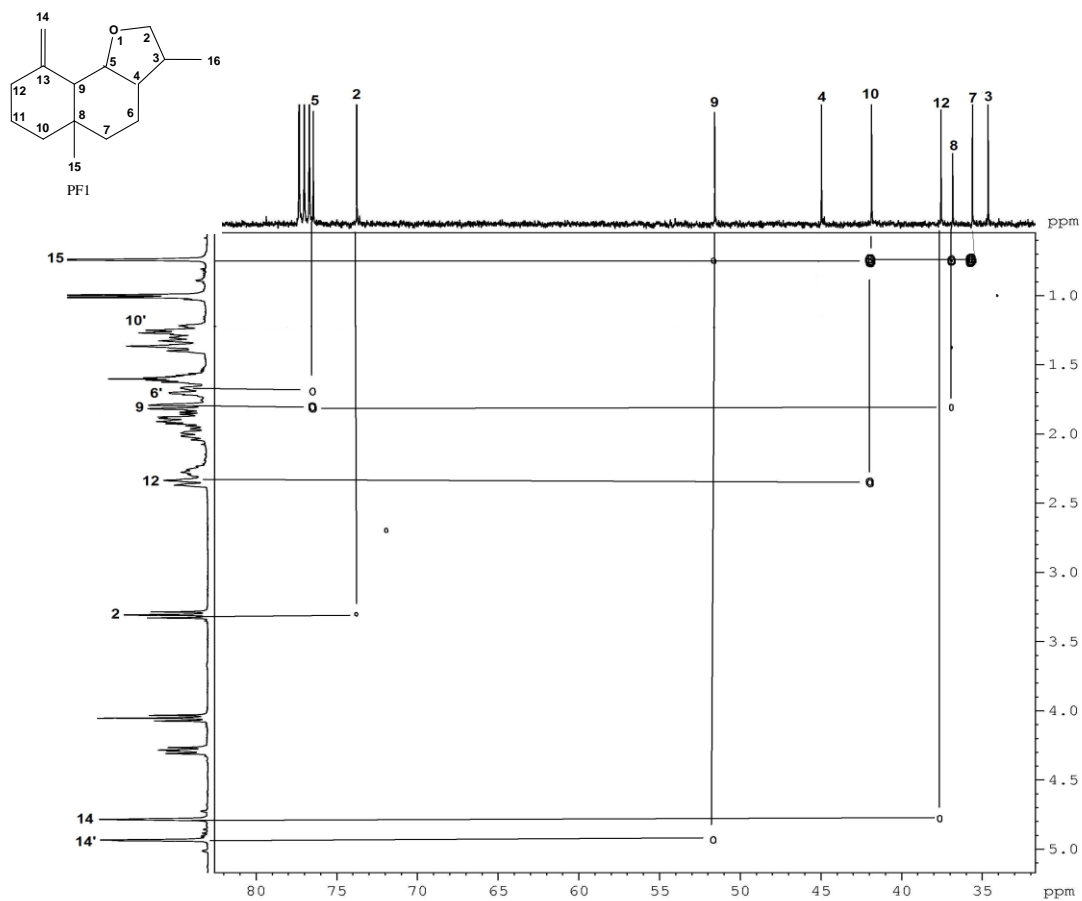


Figura 75. Expansão 2 do Espectro de COLOC de PF1, em CDCl_3 , a 400 MHz.

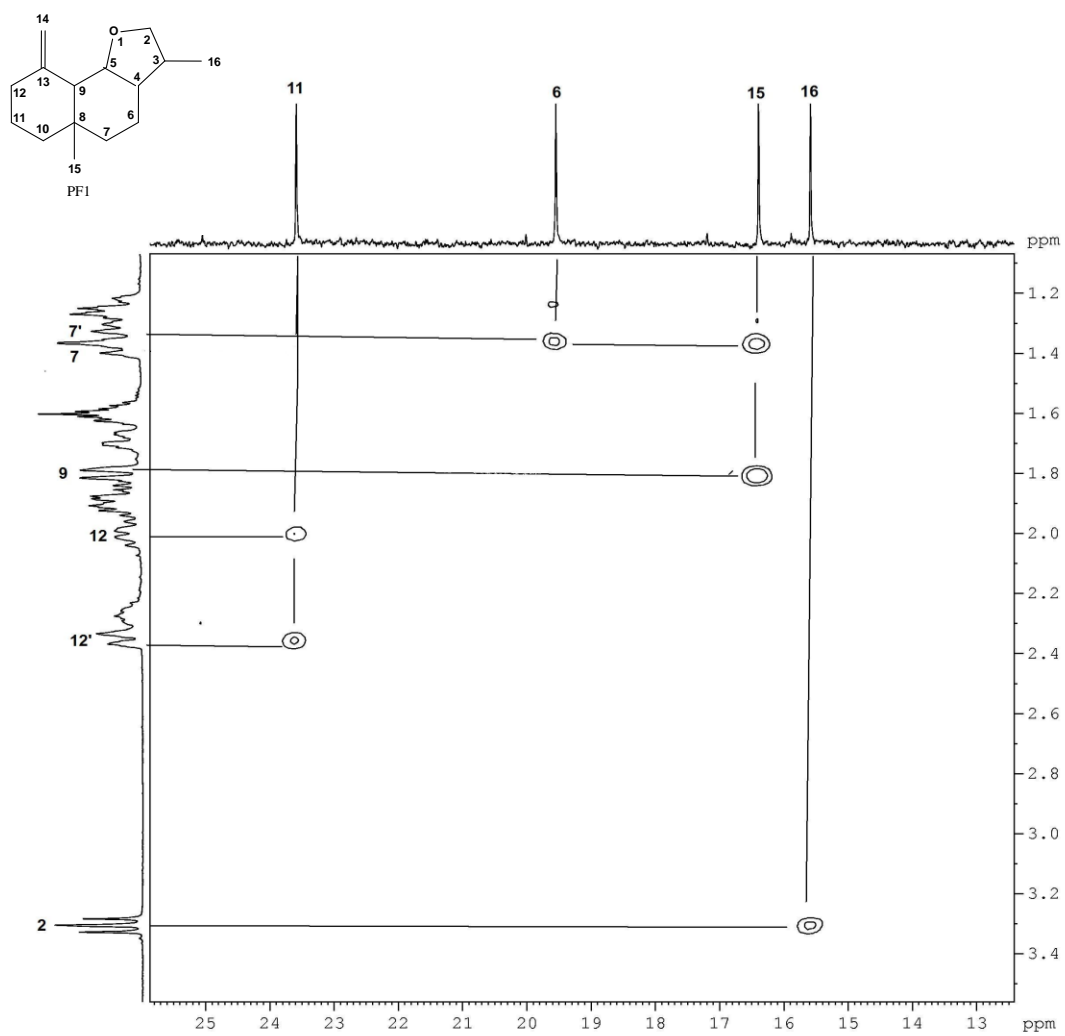


Figura 76. Expansão 3 do Espectro de COLOC de PF1, em CDCl₃, a 400 MHz

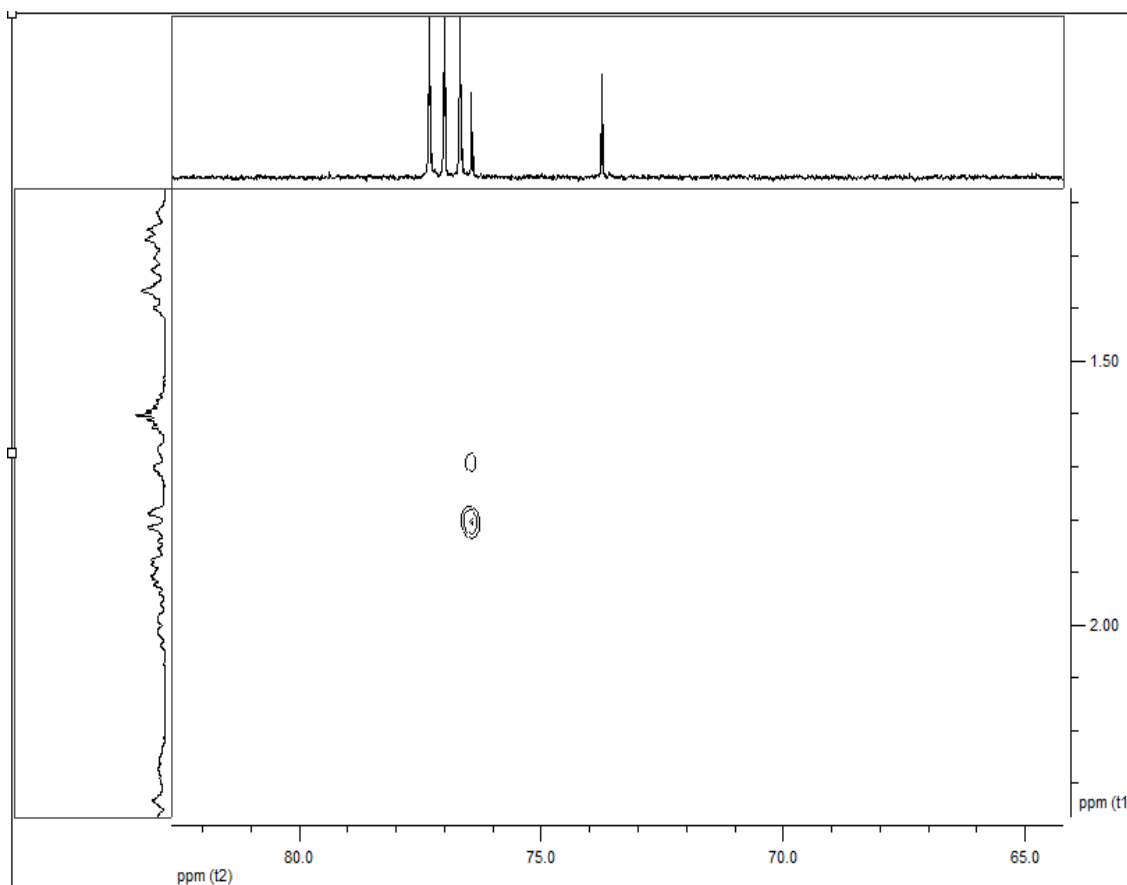


Figura 77. Expansão 4 do Espectro de COLOC de PF1, em CDCl_3 , a 400 MHz.

Tabela 25. Correlações visualizadas no espectro de COLOC para PF1

$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
H-2 (3,29)	C-16 (15,589)
H-6': (1,65)	C-5 (76,442)
H-6: (1,87)	C-8 (36,835), C-5 (76,442)
H-7 (1,385) e H7'- (1,35)	C-15 (16,395), C-6 (19,551)
H-9 (1,79)	C-5 (76,442), C-12 (37,574), C-13 (147,088), C-14 (107,298), C-15 (16,395)
H-12' (2,34) e H-12 (2,00)	C-10 (41,87), C-11(23,59), C-14 (107,298)
H-14 (14: 4,77) e H-14' (4,92)	C-12 (37,574), C-9 (51,592)
H-15 (0,73)	C-8(36,835),C-9 (51,592), C-10 (41,87),C-7 (35,622)

Desta forma, a estrutura de PF1 foi elucidada como sendo 3,5a-dimetil-9-metilenedodecahidronafto [1,2-b]furano (**Figura 65**), um novo sesquiterpeno natural possivelmente derivado do α -selineno (**Ítem 5.5.7**).

5.5.2.1.2 Determinação estrutural do composto PF2

O composto codificado **PF2**, obtido de forma pura após tratamento do óleo essencial das folhas de *N. megapotamica* por CCD preparativa, teve sua estrutura elucidada através da combinação de métodos como, a espectroscopia de massas e de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , homo e heteronucleares. Trata-se de um composto opticamente ativo, pois apresenta um $[\alpha]^{25} D : -98$ (em CHCl_3 , $c = 0,003$). Após as análises, o composto foi definido como um novo sesquiterpeno.

O espectro de massas (EI) de **PF2** (**Figura 78**) mostrou um íon molecular ($\text{M}^+\bullet$) a m/z 220, correspondendo a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$, o que foi posteriormente confirmado pela interpretação dos espectros de RMN.

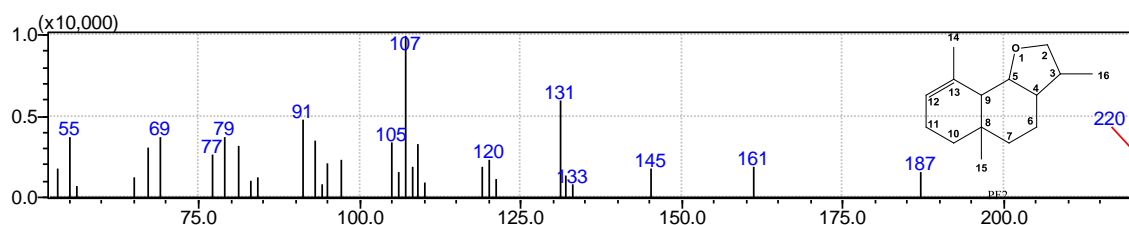


Figura 78. Espectro de massas do sesquiterpeno PF1 isolado do óleo de *N. megapotamica*.

O espectro de RMN ^1H deste composto (**Figura 79 a 82**) mostra sinais correspondentes a três grupos metílicos alifáticos, que aparecem em δ 0.79, 1.00, 1,82 ppm como um singlete, dubleto e um multiplete, respectivamente . O sinal correspondente ao único hidrogênio vinílico absorve a δ 5.34 ppm como um dubleto de dubleto. A atribuição dos demais hidrogênios da estrutura foi possível pela análise de espectros heteronucleares, como HETCOR e COLOC e homonucleares como COSY.

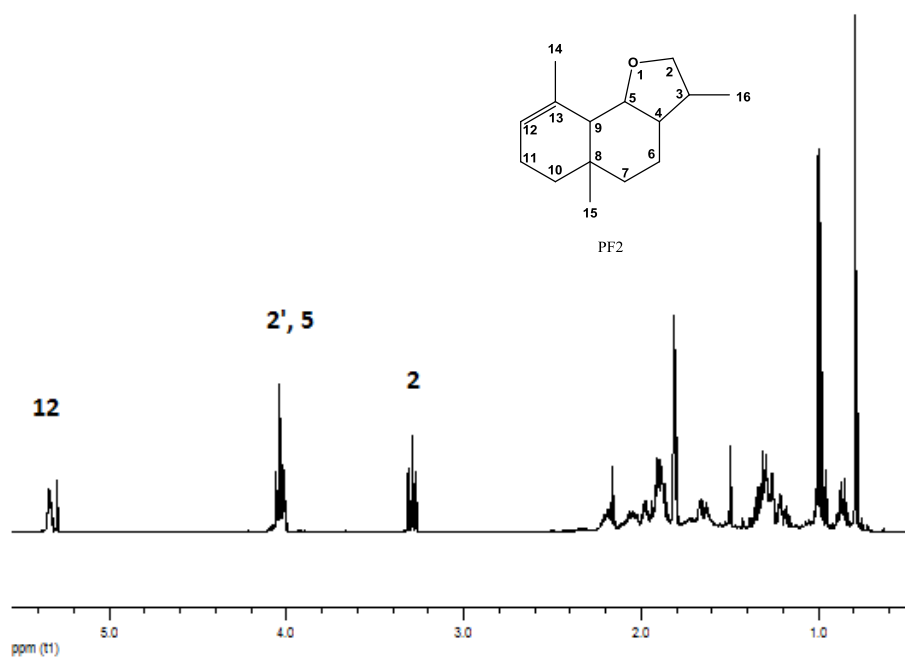


Figura 79. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz em CDCl₃, do sesquiterpeno PF2.

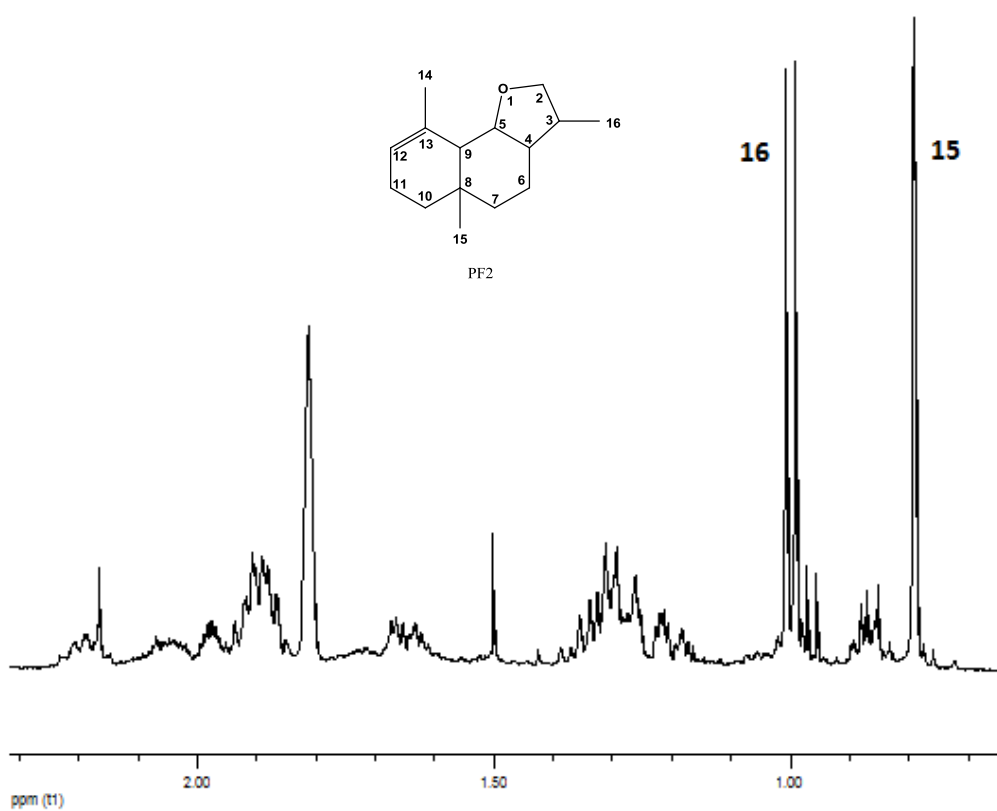


Figura 80. Espectro expansão 1 de RMN de ¹H a 400 MHz em CDCl₃, do sesquiterpeno PF2.

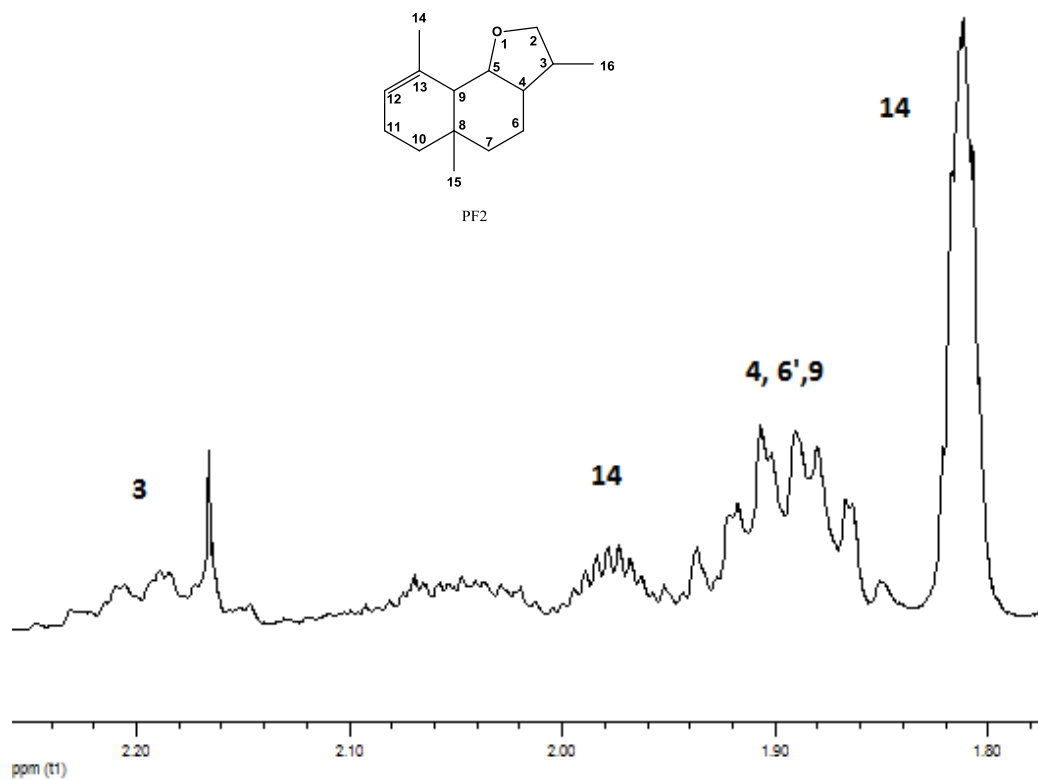


Figura 81. Espectro expansão 2 de RMN de ^1H a 400 MHz em CDCl_3 , do sesquiterpeno PF2

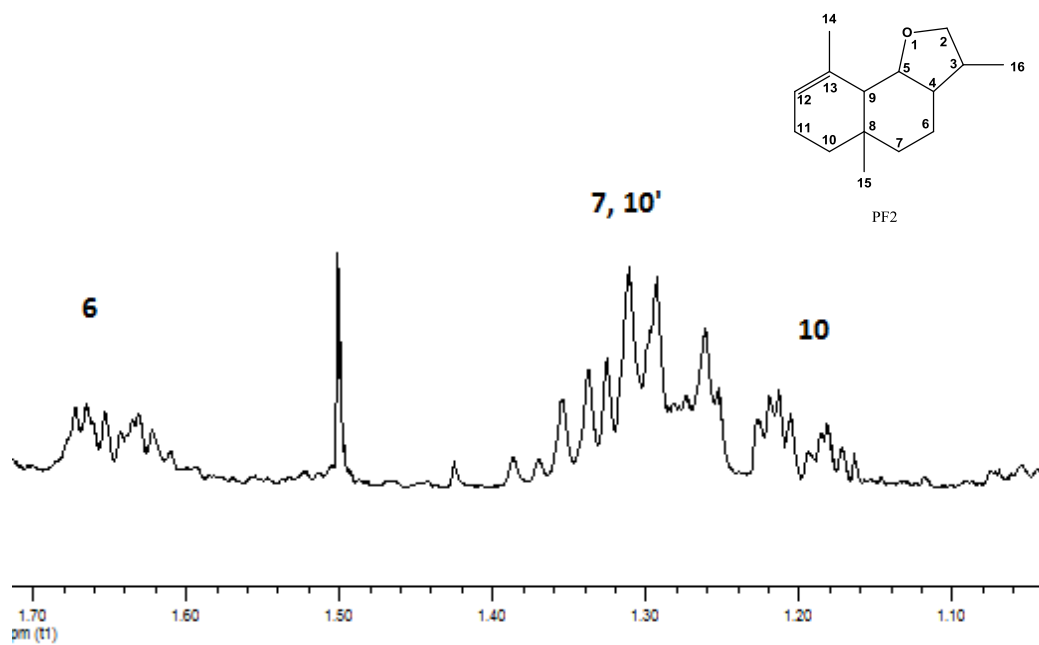


Figura 82. Espectro expansão 4 de RMN de ^1H a 400 MHz em CDCl_3 , do sesquiterpeno PF2.

O espectro de ^{13}C RMN totalmente desacoplado está apresentado na **Figura 83** e a proposta estrutural de PF2 numerada é apresentada na **Figura 84**. A apresentação dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C de PF2 está relacionada na **Tabela 27**.

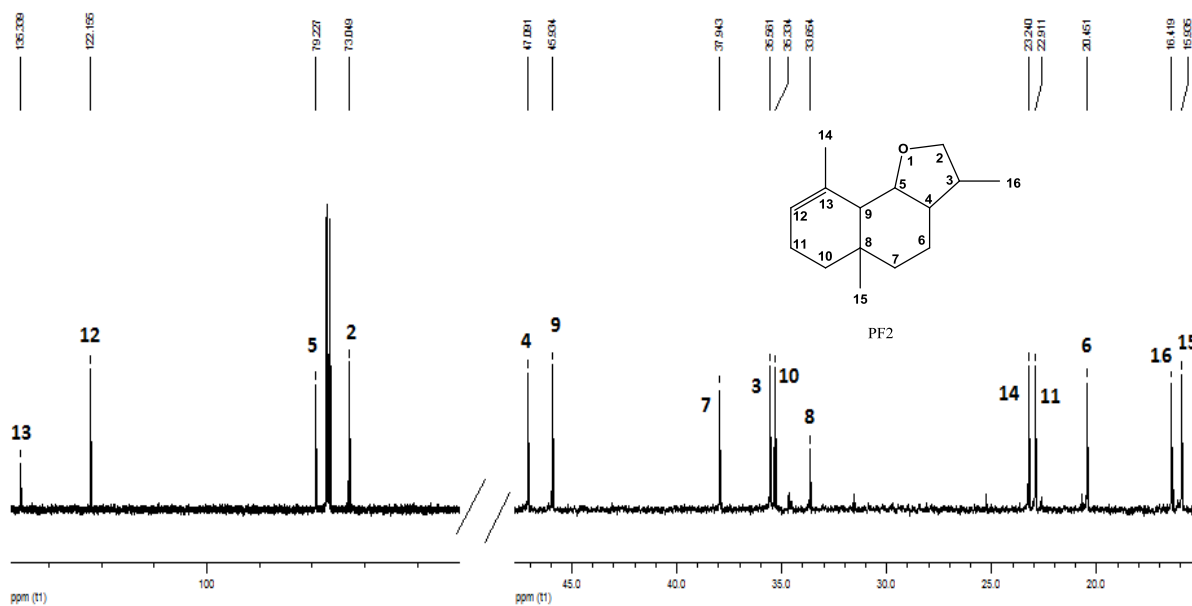


Figura 83. Espectro de RMN de ^{13}C a 400 MHz em CDCl_3 , do sesquiterpeno PF2.

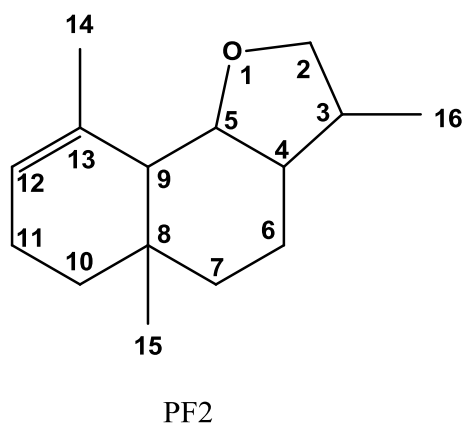


Figura 84. Proposta estrutural de PF2

O espectro de carbono totalmente desacoplado permitiu identificar 15 sinais na região entre δ 15,935 e δ 135,339 ppm (**Figura 85**), caracterizando um sesquiterpeno.

Através do experimento DEPT (**Figura 85**), verificou-se a existência de 5 sinais referentes a carbonos metilênicos (CH_2) com amplitudes negativas, e 8 sinais referentes aos carbonos metínicos (CH) e metílicos (CH_3) com amplitudes positivas. Desta forma constatou-se a presença de dois carbonos quaternários na estrutura, sendo um deles referente ao carbono vinílico que aparece em δ 135,34.

Diferente do espectro do composto anterior, nesta estrutura esta ausente o grupo $=\text{CH}_2$ externo. A presença neste caso de um grupo vinílico é uma prova de que a dupla ligação no novo composto é interna. Outro dado que diferencia esta estrutura da anterior, é a presença de um grupo metila adicional, que pelo deslocamento químico (1,82/23,2) sugere-se, uma metila ligada a carbono sp_2 . Logo, pelos dados discutidos, pode-se sugerir uma estrutura isomérica com o composto anterior, em que a diferença esta na dupla ligação exo e endo.

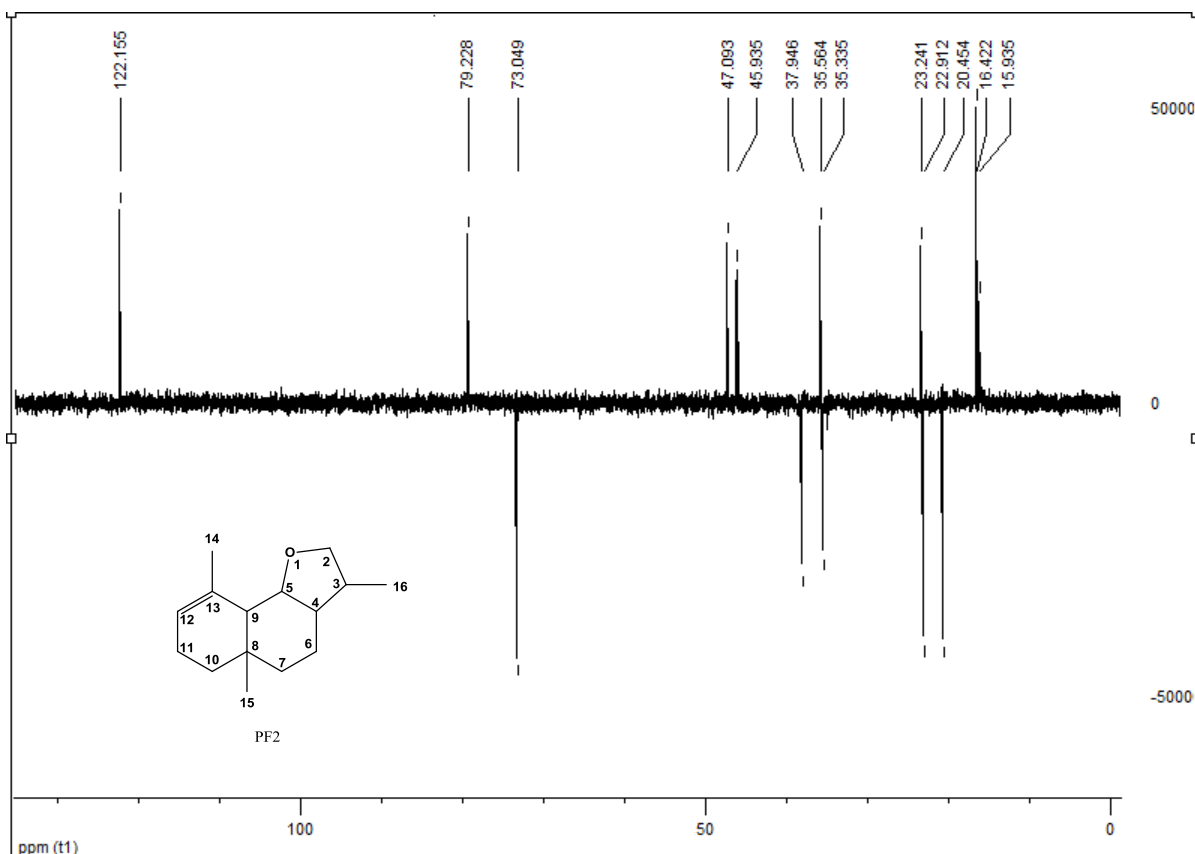


Figura 85. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT-135 em CDCl_3 , do PF2, isolado de *N. megapotamica*,

O espectro bidimensional HETCOR (não numerado) (**Figura 86**) e suas ampliações (**Figuras 87 a 88**) possibilitaram identificar os carbonos protonados,

presentes em PF2, através da correlação dos deslocamentos químicos de cada carbono com o respectivo hidrogênio.

No mesmo espectro, observa-se ainda as correlações entre os hidrogênios diastereotópicos que absorvem a δ 4,02 (2'), 3,29 (2), 1,65 (6), 1,89 (6'), 1,30 (7), 1,34 (7'), 1,22 (10), 1,26 (10'), 1,74 (11), 2,05 (11') ppm e os carbonos que absorvem a δ 73,049, 20,450, 37,943, 35,334, 22,911 ppm, respectivamente (**Tabela 27**). Com estes dados, podemos atribuir a presença de uma dupla ligação e através da fórmula molecular, verifica-se a existência de quatro insaturações, desta maneira, propõe-se a presença de outra estrutura tricíclica.

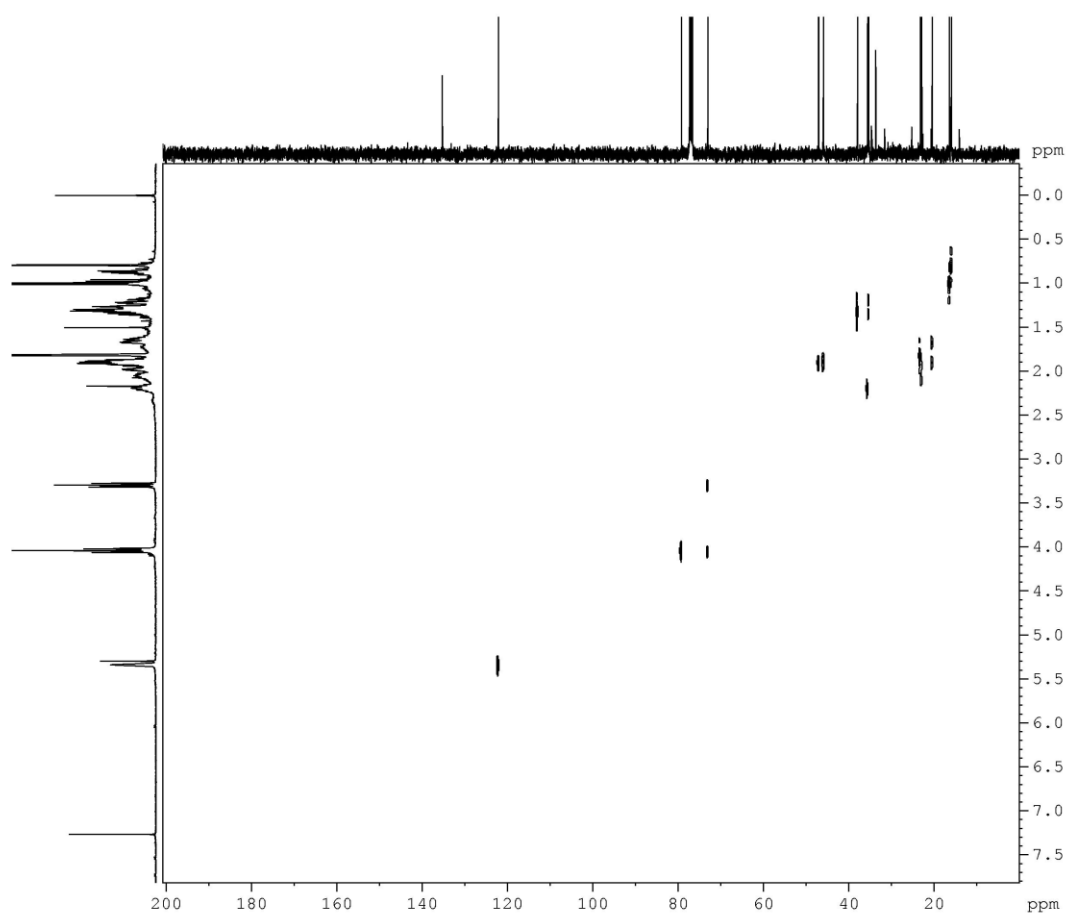


Figura 86. Espectro de HETCOR de PF2, em CDCl_3 , a 400 MHz,

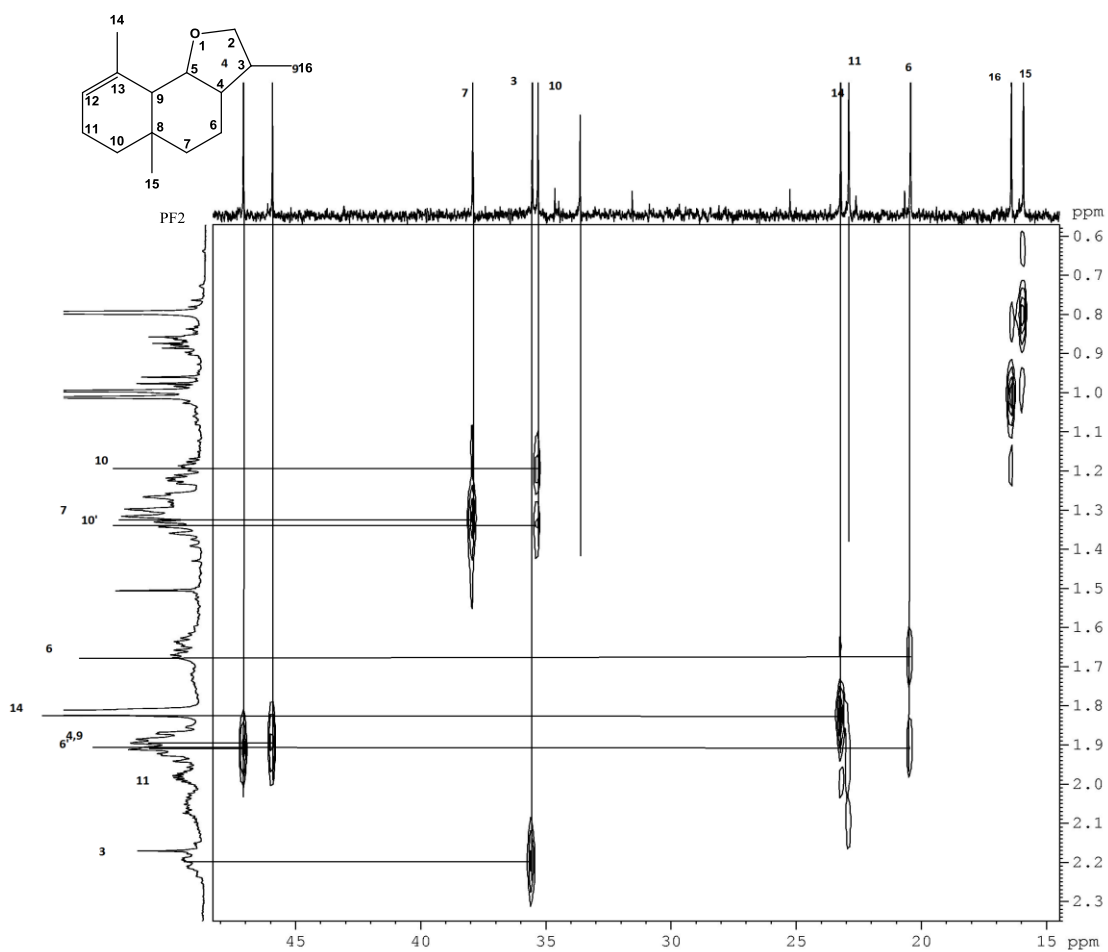


Figura 87. Expansão 1 do Espectro de HETCOR de PF2, em CDCl_3 , a 400 MHz,

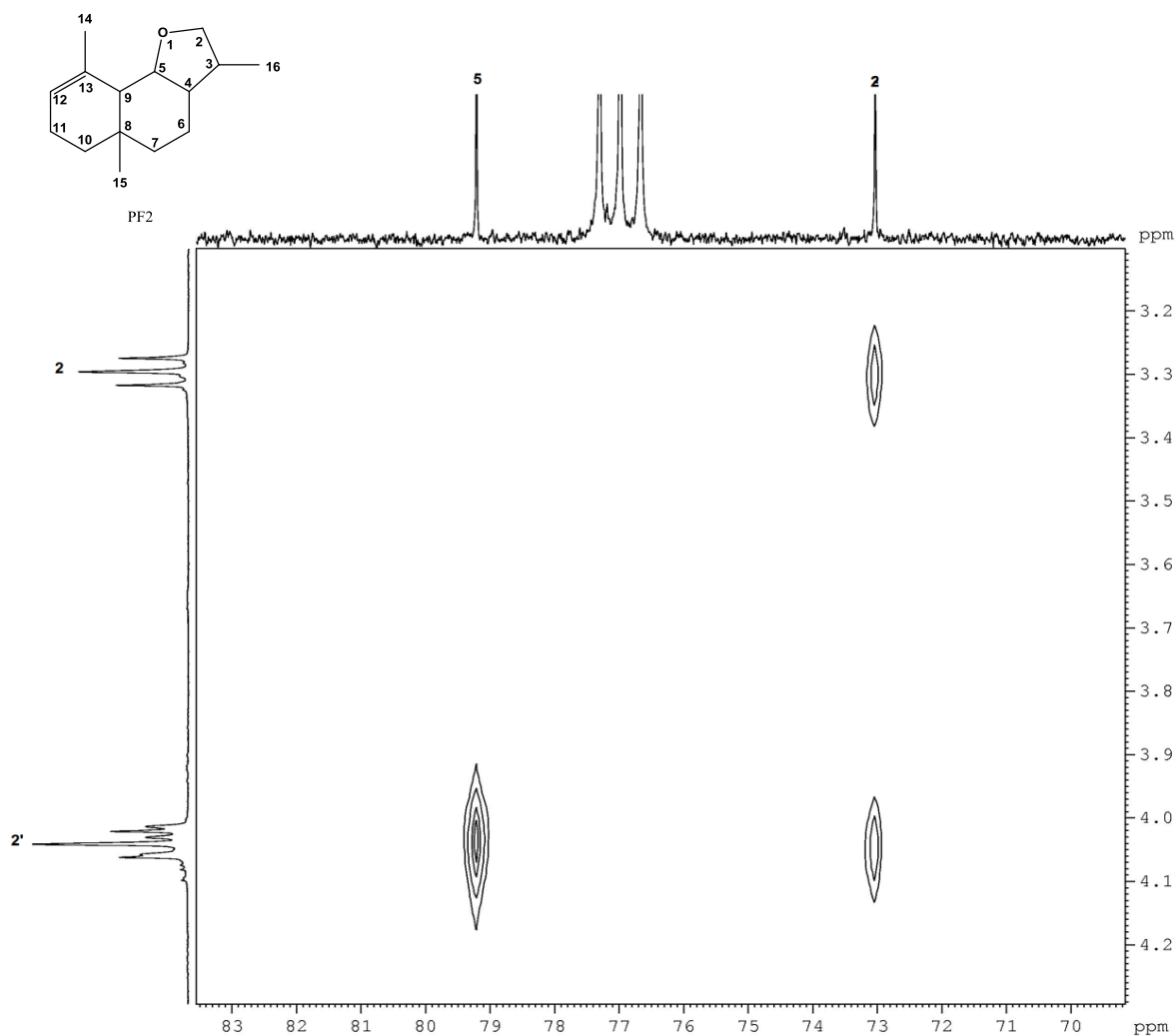
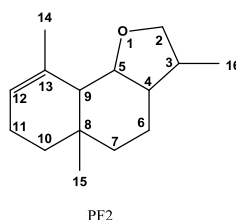


Figura 88. Expansão 1 do Espectro de HETCOR de PF2, em CDCl_3 , a 400 MHz,

Analisando-se o espectro (**Figura 86 e 87**), observa-se a ausência de correlações com os carbonos que absorvem a δ 135,339 e 33,653 ppm, confirmando a presença de dois carbonos quaternários na estrutura de PF2.

Tabela 26. Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C de PF2

Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)		$\delta^1\text{H}$ (ppm)
2	73,049	CH_2	2: 3,29 (t, 1H, $J=8,5\text{Hz}$) 2': 4,02 (t, 1H, $J=3,4\text{Hz}$)
3	35,561	CH	2,20 (m, 1H)
4	47,090	CH	1,98 (dtd, 1H, $J=2,1\text{Hz}$, $J=4,2\text{Hz}$, $J=6,2\text{Hz}$)
5	79,226	CH	4,05 (m, 1H)
6	20,450	CH_2	6: 1,65 (m, 1 H) 6': 1,89 (m, 1H)
7	37,943	CH_2	7: 1,30 (m, 1H) 7': 1,34 (m, 1H)
8	33,653	C	-
9	45,933	CH	1,90 (m, 1 H)
10	35,334	CH_2	10 : 1,22 (m, 1H,) 10': 1,26 (m, 1H)
11	22,911	CH_2	11: 1,74 (m, 1H) 11': 2,05 (m, 1H)
12	122,154	CH	5,34 (dd, 1H, $J=1,2\text{Hz}$, $J=2,7\text{Hz}$)
13	135,339	C	-
14	23,240	CH_3	1,82 (m, 1H)
15	15,935	CH_3	0,79 (s, 3H)
16	16,418	CH_3	1,00 (d, 3H, $J=6,5\text{Hz}$)

No espectro de COSY de PF2 (**Figura 89 e 90**) observaram-se dois sistemas de spins. O primeiro sistema mostra acoplamento entre H-16 e H-3, entre H-3 e H-2 e H-2', entre H-4 e H-5, entre H5 e H6 e H6', entre H-5 e H-9 (fragmento A). Além disso, foram observados os acoplamentos entre H-10 e H-10' e H-11 e H-11' e H-11 e H-11' e H-12, formando o segundo sistema de spins (fragmento B). Desta forma, os fragmentos A, B foram combinados de acordo com as correlações observadas nos outros espectros para formar a estrutura PF2. Desta forma, a estrutura de PF2 foi elucidada como sendo 3,5a,9-trimetil-2,3,3a,4,5,5a,6,7,9a,9b-decahidronafto [1,2-

b] furano (**Figura 84**), um novo sesquiterpeno natural possivelmente derivado do α -selineno (**Figura 93**).

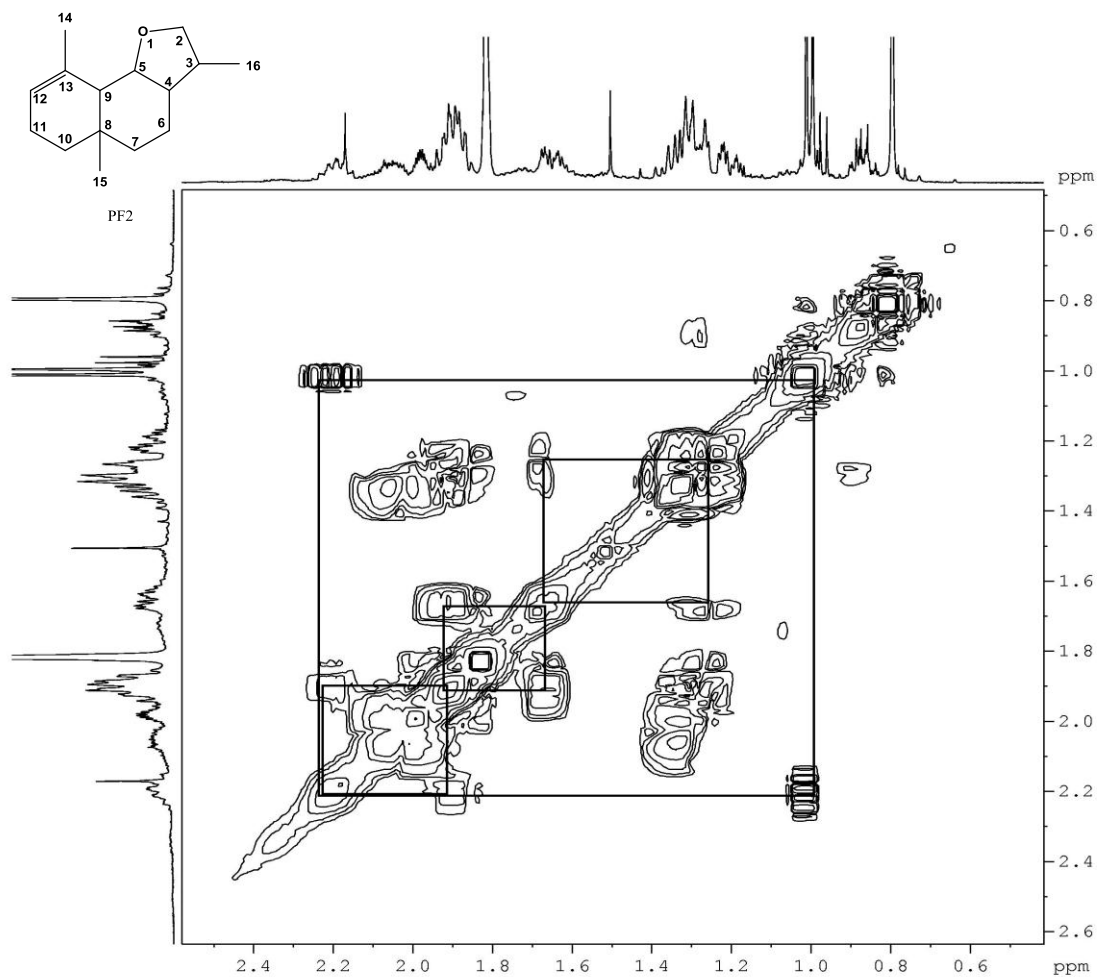


Figura 89. Espectro de COSY de PF2, em CDCl_3 , a 400 MHz,

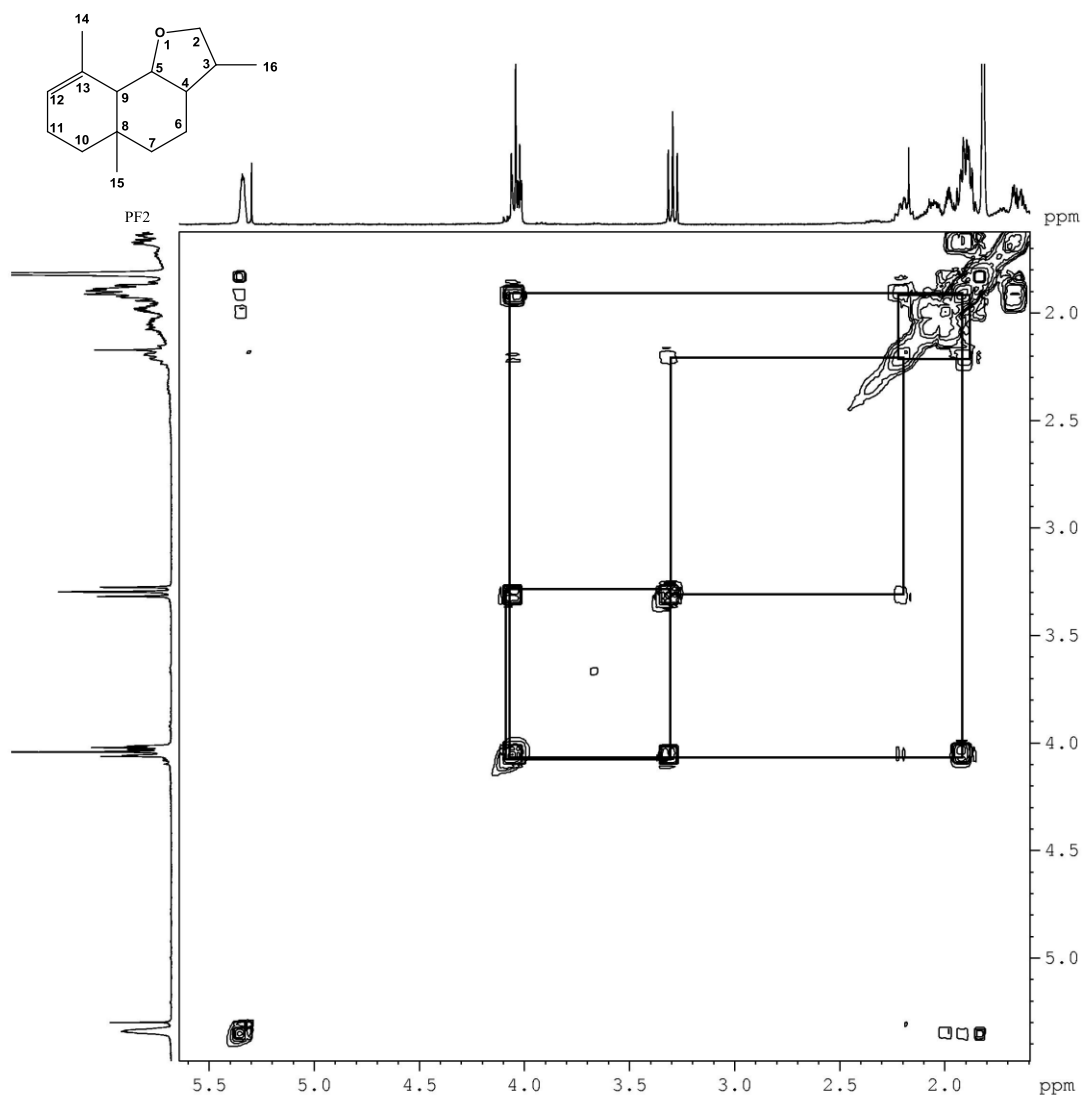


Figura 90. Espectro de COSY de PF2, em CDCl_3 , a 400 MHz,

A ausência de inserção de partes da molécula do anidrido trifluoracético, utilizado na reação para tentar separar as estruturas **PF1** e **PF2**, mostra que não houve reação. Apesar disso, ambas as moléculas separaram em CG e CCD após este experimento. Possivelmente durante a reação, algum contaminante, que estivesse dificultando a separação, tenha sido eliminado ou resquícios de anidrido trifluoracético nas amostras tenha facilitado a separação.

5.5.6 Análise do extrato hexânico das folhas de *Nectandra megapotamica*

Para constatar se os sesquiterpenos PF1 e PF2 que foram identificados nos óleos de *N. megapotamica*, eram produtos formados por aquecimento durante o processo de hidrodestilação, realizou-se uma comparação entre o óleo volátil obtido por hidrodestilação e o extrato hexânico obtido a frio das folhas de *N. megapotamica* (**Figuras 91 e 92**). A **Figura 92 A** mostra o cromatograma da coinjeção entre as duas amostras, enquanto as **Figuras 92 B e 92C** são ampliações do mesmo cromatograma.

A mistura de terpenos PF1 e PF2 está representada no tempo de retenção de 32,5 minutos (**Figura 92C**) dos dois cromatogramas em questão e também na coinjeção dos mesmos.

Desta forma, pode-se constatar que a mistura de sesquiterpenos desconhecidos, presente nos óleos voláteis, também faz parte da composição do extrato hexânico. Este experimento confirma que os sesquiterpenos PF1 e PF2 não são artefatos, formados durante o processo de hidrodestilação.

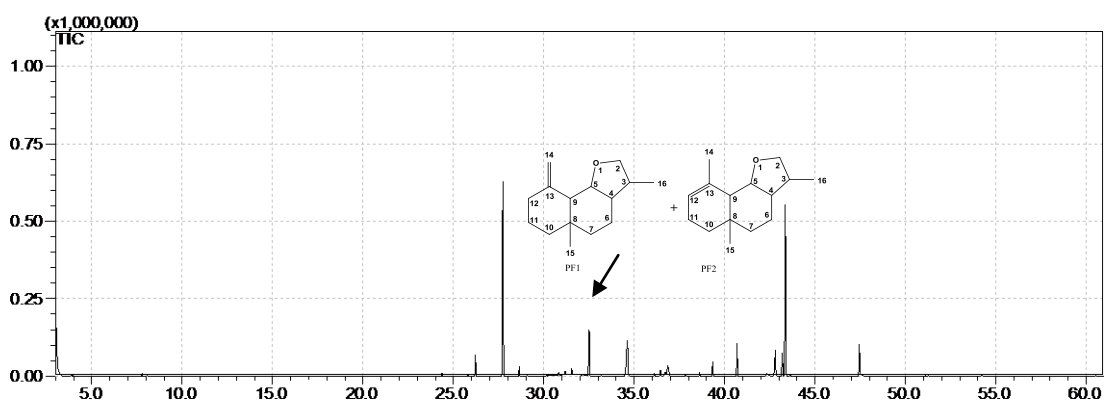


Figura 91. Perfil cromatográfico do extrato hexânico das folhas de *N. megapotamica*, A coluna utilizada é a DB5, CCSF de 25 m, Programa de análise: T_{inicial}= 50 °C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4 °C min⁻¹,

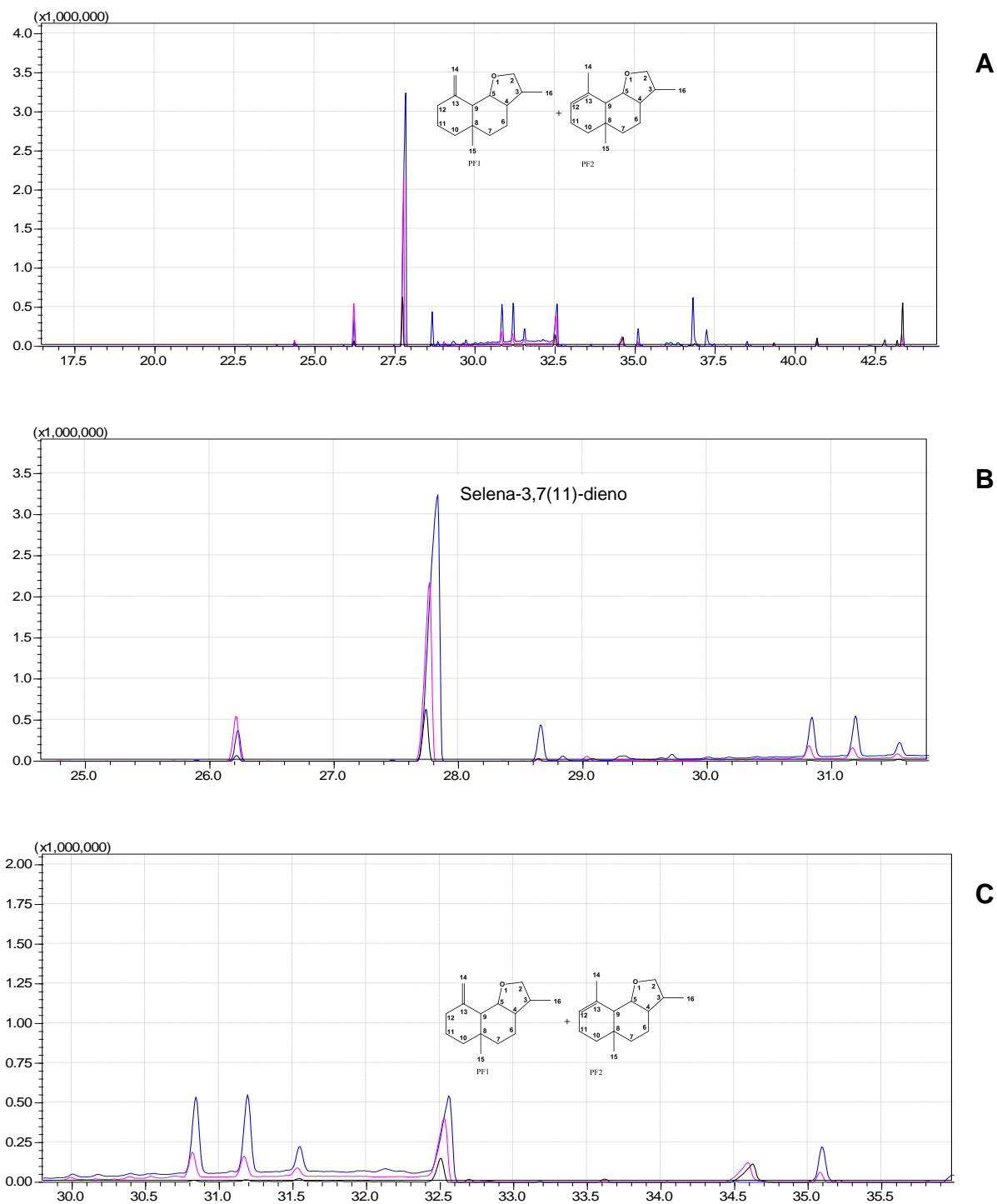


Figura 92. A: Perfil cromatográfico da comparação entre extrato hexânico (preto) com óleo essencial (azul) das folhas de *N. megapotamica*. A coinjeção também foi realizada e está representada pela cor rosa. B: Ampliação 1. C: Ampliação 2, A coluna utilizada é a 5MS, CCSF de 25 m, Programa de análise: T_{inicial}= 50 °C, T_{final}= 250 °C, rampa de 4 °C min⁻¹,

5.5.7 Proposta biossintética para os sesquiterpenos PF1 e PF2

A rota biossintética de PF1 e PF2 foi proposta partindo-se do sesquiterpeno α -selineno (**Figura 93**) que está presente na constituição do óleo de *N. megapotamica* (**Tabela 23**).

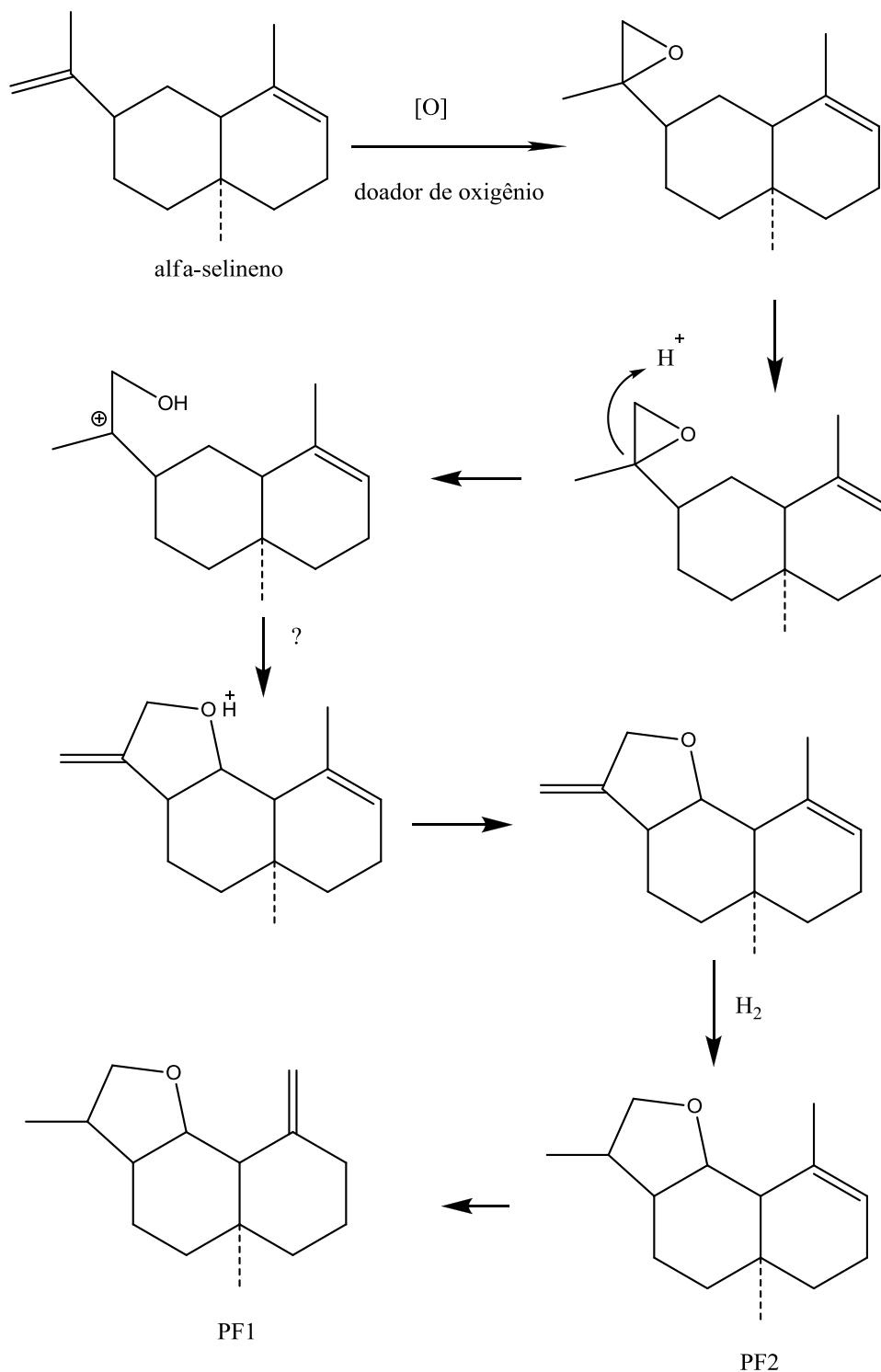


Figura 93. Proposta de biossíntese dos sesquiterpenos PF1 e PF2 partindo do α -selineno.

5.5.8 Determinação das atividades biológicas *in vitro* dos óleos essenciais de *N. megapotamica*

5.5.8.1 Teste de Atividade Antioxidante pelo Método do radical livre DPPH

As amostras selecionadas para este teste foram as folhas de *N. megapotamica* de abril e janeiro. As amostras testadas não apresentaram atividade antioxidante.

5.5.8.2 Atividade antimicrobiana

Foram utilizadas as amostras de óleo das folhas de *N. megapotamica* de abril (outono) e janeiro (verão), e os dois compostos isolados PF1 e PF2 para a determinação do CIM e CBM/CFM. Este método foi realizado a partir da técnica do NCCLS modificada.

Os resultados de CIM e CBM/CFM para os óleos de *N. megapotamica* são demonstrados na **Tabela 27** a seguir:

Tabela 27. Resultados de CIM, CBM e CFM para os óleos voláteis *N. megapotamica*.

Características	Microorganismos ^a	C		B		Padrão ^c
		CIM ^b	CBM ^b	CIM ^b	CBM ^b	CBM ^b
Gram-positivos	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.25	>5	2.5	>10	3.12 x10 ⁻³
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2.5	>5	1.25	>10	3.12 x10 ⁻³
	<i>Bacillus subtilis</i>	2.5	>5	5	>10	3.12 x10 ⁻³
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2.5	>5	1.25	>10	3.12 x10 ⁻³
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	2.5	>5	2.5	>10	3.12 x10 ⁻³
Gram-negativos	<i>Escherichia coli</i>	2.5	>5	1.25	>10	3.12 x10 ⁻³
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	>5	2.5	>10	3.12 x10 ⁻³
	<i>Shigella sonnei</i>	2.5	>5	1.25	>10	3.12 x10 ⁻³
Características	Microorganismos	CIM ^b	CFM ^b	CIM ^b	CFM ^b	CFM ^b
Fungos	<i>Candida albicans</i>	10	>10	10	>10	6.25 x10 ⁻³
	<i>Candida tropicalis</i>	5	>10	10	>10	6.25 x10 ⁻³
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	5	>10	2.5	10	10.3 x10 ⁻³
	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	10	>10	10	>10	5.15 x10 ⁻³

^a ATCC (American Type Culture Collection); ^b em mg.mL⁻¹; ^c Cloranfenicol para bactérias e nistatina para levedura; B: amostra de óleo essencial de *N. megapotamica* coletada no verão. C: amostra de óleo essencial de *N. megapotamica* coletada no outono.

A atividade antimicrobiana apresentada pelos óleos de *N. megapotamica* foi diferente, apesar da pequena diferença existente na porcentagem dos sesquiterpenos majoritários que compõem essas amostras. O óleo do outono possui

atividade bacteriostática moderada apenas frente a bactéria *S. aureus* (CIM inferior a 1,6 mg/mL). Enquanto o óleo do verão foi efetivo frente a duas bactérias gram positivas e duas gram negativas. Entretanto nenhum dos óleos foi efetivo contra fungos e nem apresentaram atividade bactericida. Para verificar a influência dos compostos PF1 e PF2 na atividade antimicrobiana dos OE, estes compostos foram testados isoladamente (**Tabela 28**).

Tabela 28. Resultados de CIM. CBM e CFM para os compostos isolados de *N. megapotamica*.

Característ	Microorganismos ^a	PF2		PF1		Padrão ^c
		CIM ^b	CBM ^b	CIM ^b	CBM ^b	CIM ^b
Gram-positivos	<i>Staphylococcus aureus</i>	6.25	200	12.5	200	3.12
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12.5	>200	25	200	3.12
	<i>Bacillus subtilis</i>	12.5	>200	25	>200	3.12
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	12.5	>200	25	>200	3.12
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	12.5	>200	12.5	200	3.12
Gram-negativos	<i>Escherichia coli</i>	12.5	>200	25	>200	3.12
	<i>Shigella sonnei</i>	25	200	25	200	3.12
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25	>200	100	>200	3.12
Características	Microorganismos ^a	CIM ^b	CFM ^b	CIM ^b	CFM ^b	CIM ^b
Fungos	<i>Candida albicans</i>	12.5	25	50	100	6.25
	<i>Candida tropicalis</i>	25	25	25	>200	6.25
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	12.5	50	25	100	10.3
	<i>Sacharomyces cervisae</i>	12.5	25	50	200	5.15

^a ATCC (American Type Culture Collection); ^b em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; ^c Cloranfenicol para bactérias e nistatina para levedura;

Pelos resultados observados na **Tabela 28**, os dois compostos apresentaram um CIM abaixo de 100 µg/ml, o que corresponde a compostos puros com atividade antimicrobiana (DUARTE, 2004). Os valores entre 6,5 e 12,5 podem ser considerados muito interessantes, se comparados aos antibióticos padrões. Comparando-se a atividade antimicrobiana apresentada pelos dois compostos, observa-se uma superioridade da atividade de PF2. Essa maior atividade deste composto possivelmente ocorre devido à presença da dupla na posição interna (endo), uma vez que a posição da dupla é a única diferença entre as duas estruturas. Frente aos microorganismos *Shiguella sonnei* e *Staphylococcus aureus*, os dois compostos apresentaram além de uma atividade bacteriostática significativa, uma atividade bactericida moderada.

As duas substâncias foram ativas contra fungos, sendo o PF2 fungicida frente a todos os fungos testados e seus valores de CIM ficaram próximos aos valores dos padrões. A atividade fungicida do composto PF1 só não foi verificada frente ao fungo *Candida tropicalis*.

Após a análise dos dados, pode-se sugerir que os dois componentes PF1 e PF2 possam ser os principais responsáveis pelas atividades dos óleos essenciais testados.

5.6 Estudo dos óleos essenciais voláteis de *N. lanceolata*

Família Lauraceae

Esta espécie foi selecionada para este trabalho, por ter semelhanças botânicas com a espécie *N. megapotamica* e não existirem relatos sobre extração e análise de seus óleos essenciais.

A análise dos óleos de galhos (**N. lan Gal**) e folhas (**N. lan Fol**) da espécie em questão por cromatografia gasosa indicou uma diferença quantitativa e qualitativa na composição entre as amostras. Desta forma, os dados destas amostras foram tratados separadamente.

5.6.1 Propriedades físicas e rendimentos dos óleos voláteis de *N. lanceolata*

Os dados físicos e rendimentos das amostras do OE de folhas e galhos da espécie em questão estão relacionados na **Tabela 29**. Os dois OE apresentaram coloração amarelo pálido.

Tabela 29. Dados físicos dos óleos essenciais de *N. lanceolata*

Amostra	Rend (%)	d	α [0,05; CH ₂ Cl ₂]	η
N. lan Fol	0,08%	0,7809	-12,7	1,6432
N. lan Gal	0,079%	0,8590	-45,7	1,6398

5.6.2 Determinação dos constituintes do óleo dos galhos e folhas de *N. lanceolata*

Os óleos voláteis dos galhos e folhas de *N. lanceolata* foram submetidos à análise cromatográfica, sendo possível a identificação de parte dos constituintes químicos. As **Figuras 94 e 95** ilustram o perfil cromatográfico das amostras, enquanto as respectivas constituições químicas encontram-se na **Tabela 30**. A numeração dos constituintes apresentada nos cromatogramas corresponde à numeração dos mesmos na **Tabela 30**.

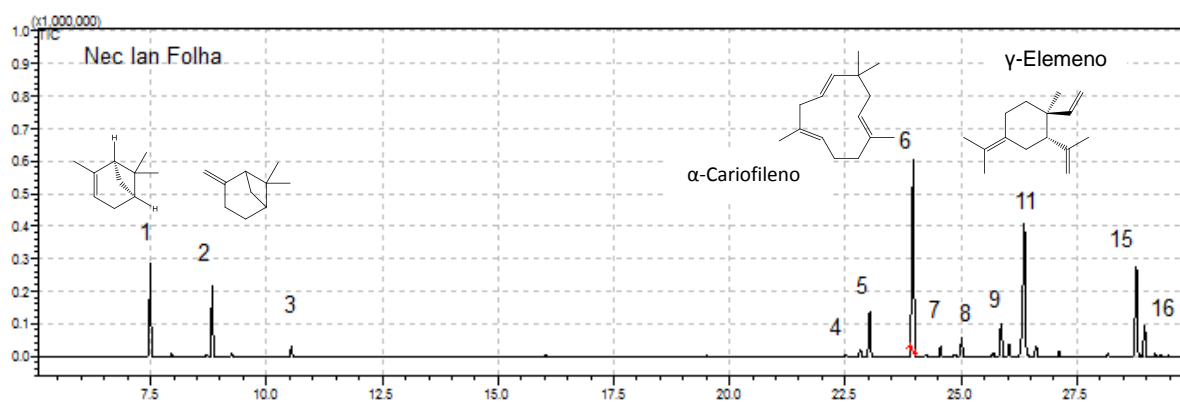


Figura 94. Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de *N. lanceolata*. A coluna utilizada é a 5MS de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50 °C. T_{final}= 250 °C. rampa de 4 °C min⁻¹.

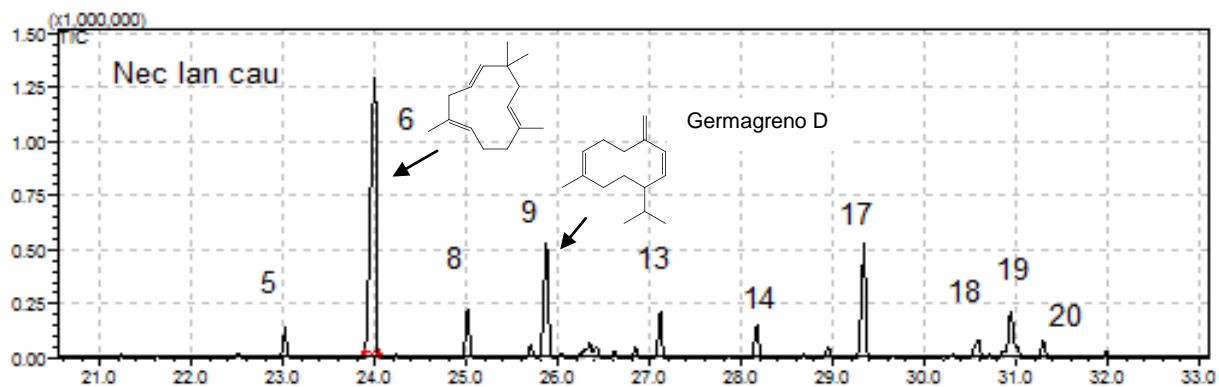


Figura 95. Perfil cromatográfico do óleo essencial dos galhos de *N. lanceolata*. A coluna utilizada é a 5MS de 25 m. Programa de análise: T_{inicial}= 50 °C. T_{final}= 250 °C. rampa de 4 °C min⁻¹.

Tabela 30. Constituintes dos óleos de *Nectandra lanceolata*.

	Componentes ^a	IK ^b	IK ^c	Nec lan fol %	Nec lan cau %	Identific.
1	α-Pineno	929	939	10,01	-	CG-EM
2	β-Pineno	972	979	7,55	-	CG-EM
3	NI	1034	-	0,95	-	CG-EM
4	NI	1378	-	0,65	-	CG-EM
5	2.4-Diisoprofenil-1- metil-1-vinil ciclohexano	1387	-	5,27	2,98	CG-EM
6	α-Cariofileno	1412	1409	27,71	44,06	CG-EM
7	β-Farnaseno	1424	1457	0,93	-	CG-EM
8	NI	1447	-	2,1	5,42	CG-EM
9	Germagreno D	1475	1485	4,05	13,56	CG-EM
10	NI	1478	-	1,28	-	CG-EM
11	γ-Elemeno	1490	1437	20,79	-	CG-EM
12	NI	1497	-	1,06	-	CG-EM
13	NI	1519	-	-	5,04	CG-EM
14	NI	1550	-	-	3,39	CG-EM
15	(-)-Espatulenol	1569	1578	12,06	-	CG-EM
16	Óxido de Cariofileno	1573	1583	3,61	-	CG-EM
17	NI	1592	-	-	14,24	CG-EM
18	Tau-Muurolol	1635	1642	-	2,78	CG-EM
19	α-Cadinol	1647	1654	-	6,29	CG-EM
20	Bulnesol	1661	1672	-	1,74	CG-EM
21	NI	2185	-	1,28	-	CG-EM
	Total			99,3	99,5	

Pode-se observar pela **Tabela 30** e cromatogramas, que galhos e folhas apresentam uma constituição química bem diferenciada. Os monoterpenos α -e β -pinenos só são encontrados nas folhas. O terpeno α -Cariofileno é encontrado em ambos os óleos, mas duplamente concentrado nos galhos. O sesquiterpeno γ -elemeno só foi detectado nas folhas, sendo inexistente nos galhos.

5.6.3 Determinação das atividades biológicas *in vitro* dos óleos essenciais de *N. lanceolata*

5.6.3.1 Teste de Atividade Antioxidante pelo Método do radical livre DPPH

As amostras selecionadas para este teste foram os óleos das folhas e galhos de *N. lanceolata*. As amostras testadas não apresentaram atividade antioxidante.

5.6.3.2 Atividade antimicrobiana

Foram utilizadas as amostras de óleo das folhas e galhos de *N. lanceolata* para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Este método foi realizado a partir da técnica do NCCLS modificada.

Os resultados de CIM e CBM/CFM para os óleos de *N. lanceolata* são demonstrados na **Tabela 31**.

Tabela 31. Resultados de CIM, CBM e CFM para os óleos voláteis *N. lanceolata*.

Características	Microorganismos ^a	N. lan caule		N. lan folha		Padrão ^c
		CIM ^b	CBM ^b	CIM ^b	CBM ^b	CIM ^b
Gram-positivos	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.25	>10	1.25	>10	3.12 x10 ⁻³
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	>10	-	>10	-	3.12 x10 ⁻³
	<i>Bacillus subtilis</i>	1.25	>10	0.62	>10	3.12 x10 ⁻³
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (Sp)	1.25	>10	0.62	>10	3.12 x10 ⁻³
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1.25	>10	1.25	>10	3.12 x10 ⁻³
Gram-negativos	<i>Escherichia coli</i>	1.25	>10	1.25	>10	3.12 x10 ⁻³
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>10	-	>10	-	3.12 x10 ⁻³
	<i>Shiguella sonnei</i>	1.25	>10	0.62	>10	3.12 x10 ⁻³
Características	Microorganismos	CIM ^b	CFM ^b	CIM ^b	CFM ^b	CIM ^b
Fungos	<i>Candida albicans</i>	>10	-	>10	-	6.25 x10 ⁻³
	<i>Candida tropicalis</i>	>10	-	>10	-	6.25 x10 ⁻³
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	>10	-	>10	-	10.3 x10 ⁻³
	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	>10	-	>10	-	5.15 x10 ⁻³

^a ATCC (American Type Culture Collection); ^b em mg. ⁻¹; ^c Cloranfenicol para bactérias e nistatina para levedura;

Como pode ser observado na **Tabela 31**, os dois óleos testados não apresentaram atividade antifúngica frente aos fungos testados e não foi detectada atividade frente às bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus epidermidis* para as diluições testadas. As duas amostras demonstraram atividades bacteriostáticas significativas, com valores de CIM = 1,25 mg/mL para a amostra de caule e valores de CIM = 0,62 a 1,25 mg/mL para a amostra de folhas. O CBM foi superior a 10 mg/ml, mostrando que nenhum óleo apresenta atividade bactericida. A maior atividade das folhas em relação aos galhos pode ser atribuída à presença dos monoterpenos pinenos e a presença de (-) espatulenol na amostra, todos conhecidos por suas atividades antimicrobianas (HAMMER et al., 1999).

6 CONCLUSÕES

Considerando-se os objetivos propostos para a realização deste trabalho e analisando-se os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Na maioria dos óleos analisados o conteúdo de sesquiterpenos foi superior ao de monoterpenos, com exceção dos óleos de *Tagetes minuta* e *Calea clematidea*, que apresentaram um excesso de monoterpenos (> 60%).
- Na maioria dos óleos analisados, observou-se uma variação na composição dos componentes químicos com a sazonalidade, local de coleta, parte da planta, e fatores ambientais, como solo ou clima.
- Como foi demonstrado neste trabalho, óleos essenciais são uma alternativa na medicina popular, por serem em alguns casos ativos frente a fungos e bactérias. Os melhores resultados de CIM frente a bactérias foram encontrados no óleo de *N. lanceolata*, enquanto a melhor atividade frente a fungos foi achada nos óleos de *T. minuta*.
- Óleos essenciais, apesar de apresentarem uma composição química muito variada, o que torna difícil a separação de seus constituintes, são uma fonte de novas moléculas bioativas de baixo peso molecular.
- Os óleos essenciais estudados neste trabalho, com exceção do óleo de *A. australe*, não mostraram nenhum potencial como antioxidantes.
- Estes mesmos óleos essenciais, quando armazenados indevidamente ou por tempo prolongado, são passíveis de decomposição, com formação de artefatos, muitas vezes inconvenientes. Foi o que ocorreu com o OE de *J. humilis* que mesmo guardado em condições ideais teve a sua composição alterada após 2 anos de estocagem.
- Das espécies estudadas neste trabalho, *N. megapotamica* mostrou-se mais interessante, tanto pela boa atividade antimicrobiana apresentada pelos seus

óleos, como por ser uma fonte de duas novas estruturas sesquiterpênicas, as quais apresentam atividade antimicrobiana próxima aos padrões.

- A espécie *N. lanceolata* foi selecionada para este trabalho, por ter semelhanças botânicas com *N. megapotamica*, entretanto, ao analisar a composição do OE das duas plantas, o único componente comum encontrado entre as mesmas foi o espatulenol.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy**. Allured Publishing Corporation. Illinois. 456p, 2001.

AESCHBACH, R. et al. Antioxidant actions of tymol. carvacrol. 6-gingerolo. zingerone and hydroxytyrosol. **Food and Chemical Toxicology**, v.32, p.31– 36, 1994.

ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanum species, **J. Agric. Food Chem.**, V.49, p.4168-4170, 2001.

ANDRADE, C. A. et al. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.17, p.231-235, 2007.

APEL, M. A. et al. Screening of the biological activity from essential oils of native species from the atlantic rain forest (São Paulo – Brazil). **Pharmacologyonline**, v.3, p.376-383, 2006.

ARAÚJO, M. E. M. **Química Analítica aplicada aos produtos naturais**. Departamento de química e bioquímica. Faculdade de Ciências de Lisboa. Lisboa. 60p, 2005.

ATKINSON, R. E.; CURTIS, R. F.; PHILLIPS, G. T. Bi-thienyl derivatives from *Tagetes minuta* L. **Tetrahedron Lett.**, v.43, p.3159-3162, 1964.

ATOUI, A. K. et al. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chem.**, v.89, p.27-36, 2005.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.444-447, 2007.

BAITELLO, J. B. et al. **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Editora Rima., v.3, p.149-223, 2003.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - a review. **Food Chem. Toxicol.**, v.46, p.446-475, 2008.

BARBOSA, A. D.; FERREIRA, R. C. V.; VALENTE, P. H. M. Atividade antimicrobiana de extratos fluidos de plantas medicinais brasileiras. **Lecta:USF**, v.12, n.2, p.13-63, Brasil, 1994.

BARROS, F. M. C. **Variabilidade sazonal. atividade antimicrobiana. fracionamento bio-guiado. isolamento e elucidação estrutural dos principais constituintes do óleo essencial de *Lippia alba***. 2008. 162 f. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**, 3.ed. Viçosa: UFV. v.3, p.237-274, 1991.

BATISTA, A. L.; GARCEZ, W. S. E.; GARCEZ, F. R. **Phytochemical study of the leaves of *Nectandra pichurim* (H.B.K.) Mez. Lauraceae**. Abstracts. 23d Annu. Meet. Braz. Chem. Soc.. Poços de Caldas. 2000.

BECKER, C. **Avaliação da Atividade Acaricida de Óleos Essenciais de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze. *Casearia sylvestris* Sw e *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq., em *Tetranychus urticae* Koch. 1836 (Acari: Tetranychidae)**. Dissertação de mestrado-UNIVATES. Lajeado, 2008.

BERRY, P. E. et al. Brasiliocroton a new crotonoid genus of Euphorbiaceae from eastern Brazil. **Systematic Botany**, v.30, p.357-365, 2005a.

BERRY, P. E. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and trnL-trnF DNA sequence data. **American Journal of Botany**, v.92, p.1520-1534. 2005b.

BERTOMEU, J. M. et al. Up-regulation of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase enhances production of essential oils in transgenic Spike Lavander. **Plant Physiology**, v.142, p.890-900, 2006.

BERTUCCI, A. et al. Prospección química Del bosque de galería Del río Uruguay. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.1, p.21-25, Jan/mar. 2008.

BHAVANANI, S. M.; BALLOU. C. H. New agents for Gram-positive bacteria. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.3, p.528-534. 2000.

BICCHI, C.; D'AMARO, A.; RUBIOLO, P. Cyclodextrin derivatives as chiral selectors for direct gas chromatographic separation of enantiomers in the essential oil aroma and flavours fields. **Journal of Chromatography A.**, v.8, p.843-899, 1999.

BIESALSKI, H. K. et al. Antioxidant vitamins in prevention. **Clin. Nutr.**, v.16, n.3, p.151-155, Jun. 1997.

BOHLKE, M. et al. Costaricine. a new antiplasmodium bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Nectandra salicifolia* trunk bark. **Journal of Natural Products**, v.59, p.576-584, 1996.

BOHLMANN, F. et al. Two sesquiterpene and three diterpene lactones from *Acanthospermum australe*. **Phytochemistry**, v.20, p.1081-1083, 1981.

BRANCO, A.; PIZZOLATTI, M. G. CGAR e CGAR-EM na análise dos constituintes químicos isolados do hexânico extrato de *Sebastiania argutidens* (EUPHORBIACEAE), **Quim. Nova**, 25, 15, 2002.

BRAZ, F. R.; FIGLIUOLO, R.; GOTTLIEB, O. R. Neolignans from *Nectandra* Species. **Phytochemistry**, v.19, p.659-662, 1980.

BRITO, A. F. R. **Análise de variação sazonal e das atividades antifúngica e antimicrobiana em óleos essenciais de *Ocotea porosa* (Nees) Barroso e *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.** Dissertação de mestrado-USP, São Paulo, 2009.

BUFFA, B.; COSTA, G. E.; GHIRARDI, P. Glaziovine versus diazepam: a double-blind clinical trial. **Curr. Ther Res. Clin. Exper.**, v.16, p.621-627, 1974.

CAMM, E. L.; TOWERS, G. H. N.; MITCHELL, J. C. UV-mediated antibiotic activity of some Compositae species. **Phytochemistry**, v.14, p.2007-2011, 1975.

CARVALHO, L. H. et al. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied "in vivo" in Plasmodium berghei-infected mice and "in vitro" against *Plasmodium falciparum* in culture. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.24, p.1113-1123, 1991.

CARVALHO, L. H.; KRETTLI, A. U. Antimalarial chemotherapy with natural-products and chemically defined molecules. **Mem. I. Oswaldo Cruz**, v.86, p.181-184, 1991.

CARVALHO, P. E. R. Canela Branca. **Circular Técnica 63 do Ministério da Agricultura pecuária e abastecimento ISSN 1517-5278**, 7p, 2002.

CHAN, G. F. Q, TOWERS, G. H. N., MITCHEL, J. C. Ultraviolet-mediated antibiotic activity of thiophene compounds of *Tagetes*. **Phytochemistry**, v.14, p.2295-2296, 1975.

CHANDHOKE, N.; GHATAK, B. J. R. In vivo studies of the effects of *Tagetes* oil. **Indian Journal Medicine Research**, v.57, p.864, 1969.

CHAVERRI, C.; CICCIO, J. F. Volatile compounds of *Nectandra salicina* (Lauraceae) from Costa Rica and their cytotoxic activity on cell lines **Quim. Nova**, v.32, p.417-420, 2009.

CRAVEIRO, A. A. et al. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza. Edições:UFC, 1981, 210p.

CUBILLO, D. G.; SANABRIA, L. H. Evaluación de repelencia y mortalidad causada por insecticidas comerciales y extractos vegetales sobre Bemisia tabaci. **Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)** v.53, p.65-72, 1999.

DAGHERO, J. et al. **Isolation of *Tagetes minuta* L. oil using supercritical CO₂ extraction**. Acta Horticulturae 503: II WOCMAP Congress Medicinal and Aromatic Plants. part 4: Industrial Processing. Standards & regulations. Quality. Marketing. economics. p.21-26, 1999.

DEBENEDETTI, S. et al. 6-Methoxy flavonoids from *Acanthospermum australe*. **J. Nat. Prod.**, v.50, p.325. 1987.

DELLA PORTA, C. et al. Isolation of eucalyptus oil by supercritical fluid extraction, **Flavour and Fragrance Journal**, v.14, n.4, p.214-218, 1999.

DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. **Braz. J. Microbiol.**, v.33, p.166-168, 2002.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. England: John Willey & Sons, 2000. cap. 5, p.153-172.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-candida activity of brazilian medicinal plants, **Journal. Ethnopharmacol.**, v.97, p.302-311, 2005.

DUARTE, M. C. T. et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos de espécies da coleção de plantas medicinais. **Rev. Bras.Farmacogn.**, v.14, p.06-08, 2004.

DUDAVERA, N. et al. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, v.135, p.1893-1902, 2004.

EL-DEEB, K. S. et al. Chemical composition of the essential oil of *Tagetes minuta* growing in Saudi Arabia. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v.12, n.1, 2004.

ELOFF, J. N. et al. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v.64, p.711-713, 1998.

ELOFF, J. N. It is possible to use herbarium specimens to screen for antibacterial components in some plants. **Journal. Ethnopharmacol.**, v.67, p.355–360, 1999.

Farmacopéia Brasileira. 4ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FLACH, A. et al. Chemical analysis and antifungal activity of the essential oil of *Calea clematidea*. **Planta Med.**, v.68, n.9, p.836-838, 2002.

FLEISCHER, T. C.; AMEADE, E. P. K.; SAWER, I. K. Antimicrobial activity of the leaves and flowering tops of *Acanthospermum hispidum*. **Fitoterapia**, v.74, p.130-132, 2003.

FRANCO, J. et al. Composição química e atividade antimicrobiana in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Mull. ex Benth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, p.191-194, 2005.

GARCEZ, F. R. et al. **Constituintes químicos das cascas do caule e das folhas de *Nectandra megapotamica* (Lauraceae)**. In: 30a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia. Livro de Resumos da 30a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. São Paulo : Sociedade Brasileira de Química. p. PN-286, 2007.

GARCEZ, F. R. et al. Phenylpropanoids and other bioactive constituents from *Nectandra megapotamica*. **Quím. Nova**, v.32, n.2, p.407-411, 2009.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. L. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quím. Nova**, v.30, p.375-381, 2007.

GRAINGE, M.; AHMED, S. **Handbook of plants with pest-control properties**. Wiley. New York. 1988.

GROVER, G. S.; RAO, J. T. In vitro antimicrobial studies of the essential oil of *Tagetes erecta*. **Perfum. Flavor**, v.3, n.5, p.28, 1978.

GUIMARÃES, L. A. C. **O gênero *Croton* L. seção *Cyclostigma* Griseb. e seção *Luntia* (Raf.) G. L. Webster (Euphorbiaceae) ocorrentes na Amazônia brasileira**. 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado em Botânica Tropical)—Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2006.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p.1-93, 2006.

HAMMER, K. A., CARSON, C. F., RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**. v.86, p.985-990, 1999.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. **Journal Nat. Prod.**, v.59, p.205-215, 1995.

HETHELYI, E. et al. GC-MS Analysis of the essential oils of four *Tagetes* species and the anti-microbial activity of *Tagetes minuta*. **Flavour Frag. J.**, v.1, p.169-173. 1986.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. Série de textos da Escola de Verão em Química. IV. Ed UFSCar. São Carlos. 2003.

HUDSON, J. B. **Antiviral compounds from plants**. CRC Press. Inc. Boca Raton. FL.1990.

HUNTER, W. Structure and reactivity in the non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v.282, p.21573-21577, 2007.

HUSSAIN, A. L. et al. Chemical composition antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations, **Food Chem.**, v.108, p.986-995, 2008.

JACOBSON, M. **Glossary of plants derived insect deterrents**. CRC Press. Inc. Boca Raton. FL. 1990.

JOVANOVIC, T. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Acinos arvensis* (Lam.) Dandy from Serbia, **Flavor Fragr. J.**, v.20, p.288-290. 2005.

JUDD, W. S. et al. **Plant Systematics: A phylogenetic approach**. Massachusetts: Sinauer Associates Inc. Publishers. 1999.

KAMATOU, G. P. P. et al. Seasonal variation in essential oil composition, oil toxicity and the biological activity of solvent extracts of three South African *Salvia* species. **South African J. Bot.**, v.74, p.230–237, 2008.

KAUL, P. N. et al. Essencial Oil Composition of *Tagetes minuta* L. Fruits. **Journal of Essencial Oil Research.**, mar/abr, 2005.

KRETTLI, A. U. et al. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: A review. **Mem. I. Oswaldo Cruz**, v.96, p.1033-1042, 2001.

KVIECINSKI, M. R. **Avaliação das atividades antioxidante, antiinflamatória e antitumoral do extrato bruto hidroetanólico e frações de *Bidens pilosa* L. (Asteraceae).** 134 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia)-Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis-SC, 2007.

LARSON, R. A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, v.27, n.4, p.969-978, 1988.

LAVABRE, M. **Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais.** 4 ed. Rio de Janeiro. Record. 1997.

LIMA, I. O. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.16, p.197-201, 2006.

LIN, C. et al., DPPH Free-Radical Scavenging Activity, Total Phenolic Contents and Chemical Composition Analysis of Forty-Two Kinds of Essential Oils, **Journal of Food and Drug Analysis**, Vol. 17 No. 5, p.386-395, 2009.

LOEWE, H. Recent advances in the medicinal chemistry of anthelmintics. In: J. Maas (ed.). **Medicinal chemistry IV.** Elsevier: Amsterdam, 1974. p. 271-301.

LORENZI, H. **Manual de identificação e de controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional.** 5. ed. Nova Odessa. São Paulo: Instituto Plantarum. 2000b.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** Nova Odessa. SP: Instituto Plantarum. 2002. 161p.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil – terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas.** 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2000a. 640p.

MACEDO, M. E. Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). **Mem. I. Oswaldo Cruz**. v.92, p.565-570, 1997.

MAHMOUD, S. S.; CROTEAU, R. B. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. **Trends in Plant Science**, v.8, p.1360-1385, 2002.

MARADUFU, A.; LUBEGA, R. ; DOM. F. Isolation of (5E)-Ocimenone, a mosquito larvicide from *Tagetes minuta*. **Lloydia. (Cinnci.)** v.41, p.181-183, 1978.

MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae - Aplicação em Produtos Alimentícios **Brazilian Journal. Food Technol.**, v.10, p.96-103, 2007.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae. **Revista Floresta e Ambiente**, v.8, n.1, p.195-206, Jan./dez. 2001.

MARTINS, L. R. R. et al. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de ^1H e ^{13}C do acetato de acantoaustralida. **Rev. bras. Farmacogn.**, v.16, n.4, p.490-496, 2006.

MARUYAMA, N. Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. **J. Inflamm. (Lond.)**, v.2, n.1, 2005.

MATHELA, C.; SINGH, K. K.; GUPTA, V. K. Synthesis and in vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol derivatives. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v.67, n.4, p.375-380. 2010.

MATSUNAGA, K.; SAITOH, M.; OHIZUMI, Y. Acanthostrala a novel antineoplastic cis-cis-cis-germacranolide from *Acanthospermum australe*. **Tetrahedron Lett**, v.37, p.1455-1456, 1996.

MELO, E. A. et al. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas **Ciênc. Tecnol. Alim.**, v.26, p.639-644, 2006.

MELO, N. T. K.; DIAS, I. E. C.; YOSHIDA, M. **Constituintes químicos de *Nectandra saligna* Nees (Lauraceae)**. Dissertação de mestrado. 2003.

MENDES, N. M. et al. Screening of Asteraceae (Compositae) Plant extracts for molluscicidal activity. **Mem. I. Oswaldo Cruz**, v.94, p.411-412, 1999.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakarin **J. Sci. Technol.**, v.26 n.2, p.211-219, 2004.

MORAIS, A. A. et al. Óleos terpênicos do Estado do Rio de Janeiro . **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.44. Suplemento. Trabalho apresentado ao 5º Congresso Internacional de Óleos Essenciais. Rio de Janeiro. 1971. p.320- 322.

MORAIS, S. M. et al. Essential oil of *Acanthospermum australe* DC. **Journal of essential oil research**, v.9, n.5, p.601-602, 1997.

MORAIS, S.M. et al. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.15, p.169-177, 2005.

MOREIRA, et al. Crystal structure and theoretical calculations of Julocrotine a natural product with antileishmanial activity Nternational. **Journal of Quantum Chemistry**, v.108, n.3, p.513–520, 2008.

MOREIRA, F. **Plantas que curam**. Hemus editora. 5ª edição, São Paulo, 1996.

MUKHERJEE, P. K.; VENKATESH, M.; GANTAIT, A. Ayurveda in modern medicine: development and modification of bioactivity. apud MANDER, L.; LIU, H. **Comprehensive natural products II**. Hardbound: Elsevier. cap.3.14, 2010. p.479-507.

MÜLLER, J. Euphorbiaceae apud MARTIUS C. F. P.; EICHLER A. G. **Flora Brasiliensis** v.11, 1873/1874. p.1-750, p.1-104.

MÜLLER, J. Euphorbiaceae exceto subordo Euphorbieae. In **Prodromus Systematics Universalis Regni Vegetabilis** (A.P. De Candolle. ed.) v.15, 1866. p.189-1286.

MÜLLER, J. Euphorbiaceae. **Linnaea** v.34, p.1-224, 1865.

MÜLLER, J. **Flora Brasiliensis**. Vol. XI. Part II. Fasc. 61 Coluna 279 - 280 Publicado em 01-Fev-1873.

NAKAGAWA, Y. et al. A Potent Apoptosis-Inducing Activity of a Sesquiterpene Lactone. Arucanolide. in 105Anexo 2 HL60 Cells: a Crucial Role of Apoptosis-Inducing Factor. **Journal of Pharmacological Sciences**. V.97, p.242-252, 2005.

NASCIMENTO, A. M. Antimicrobial activity of extracts and some compounds from *Calea platylepis*. **Fitoterapia**, v.75, p.514-519, 2004a.

NASCIMENTO, A. M. Trypanocidal and antifungal activities of p-hydroxyacetophenone derivatives from *Calea uniflora* (Heliantheae. Asteraceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.56, p.663-669, 2004b.

PALMEIRA-JUNIOR, S. F. et al. Constituintes químicos das folhas de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.397-402, 2006.

PASSOTO, J. A.; PENTEADO, M. V. C.; MANCINI-FILHO, J. Atividade antioxidante do β -caroteno e da vitamina A. Estudo comparativo com antioxidante sintético. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 1, p. 68-72, 1998.

PORTILLO, A. et al. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **J. Ethnopharmacol.**, v.76, p.93-98, 2001.

PRUSKI, J. F.; URBATSCH, L. E. Five new species of *Calea* (compositae: Heliantheae) from Planaltine Brazil. **Brittonia**, v.40, p.341-356, 1988.

QUER, P. F. **Plantas Medicinales**. Editorial Labor: Barcelona, Espanha. 1985.

RADULOVIC, N. et al. Essential oil composition of four *Croton* species from Madagascar and their chemotaxonomy. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.34, p.648-653, 2006.

RANDAU, K. P. et al. Estudo Farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* pax & hoffm. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, p.89-96, 2004.

RODRIGUEZ, E.; MABRY, T. J. Tageteae chemical review. apud: HEYWOOD, V. H.; HARBORNE, J. B.; TURNER, B. L. (eds.). **The biology and chemistry of the Compositae**. Academic Press. London. 1977.

RODRIGUEZ, M. et al. Genetic evidence of branching in the isoprenoid pathway for the production of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate in *Escherichia coli*. **FEBS Letters**, v.473, p.328-332, 2000.

ROESLER, R et al. Atividade Antioxidante de frutas do cerrado. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.27, n.1, p.53-60, 2007.

ROHDICH, F. et al. Biosynthesis of terpenoids 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF) from *Plasmodium falciparum*. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n.11, p.3190–3197, 2001.

ROMOFF, P. et al. Chemical composition of volatile oils from leaves of *Nectandra megapotamica* Spreng. (Lauraceae). **Quim. Nova**, v.33, n.5, p.1119-1121, 2010.

SANON, S. et al. Antiplasmodial activity of alkaloid extracts from *Pavetta crassipes* (K. Schum) and *Acanthospermum hispidum* (DC). two plants used in traditional medicine in Burkina Faso. **Parasitol Res.**, v.90, p.314-317, 2003.

SANTOS, F. D.; GILBERT. B. The Alkaloids of *Nectandra megapotamica*. **Phytochemistry**, v.14, p. 821-822, 1975.

SAXENA, B. P.; KOUL, O. Essential oils and insect control, In: C.K. Atal and B.M. Kapur (eds.). Cultivation and utilization of aromatic plants. **Council of Sci. Res.**, p. 766-776, 1982.

SAXENA, B. P.; SRIVASTAVA, J. B. *Tagetes minuta* L. oil: A new source of juvenile hormone mimicking substance. **Indian J. Expt. Biol.**, v.11, n. 1 p. 56-58, 1973.

SCOPEL, M. **Análise Botânica. Química e Biológica Comparativa entre Flores das Espécies *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schltld. e Avaliação Preliminar da Estabilidade**. 2005. 227 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia-UFRGS, Porto Alegre, 2005.

SERRATO, M. A. C.; QUIJANO, A. L. **Usos de algunas especies de *Tagetes* Revisión bibliográfica (1984-1992)**. Memorias I Simposium Internacional y II Reunión Nacional sobre Agricultura Sostenible Tradicional. CEICADAR. Colegio de Posgraduados. Puebla. 1994. p.228-238.

SHIMIZU, M. et al. Chemical and pharmaceutical studies on medicinal plants in Paraguay. I. Isolation and identification of lens aldose reductase inhibitor from "Tapecué", *Acanthospermum australe*, **O. K. Chem Pharm. Bull.**, v.35: p.1234-1237 1987

SILVA FILHO, A. A. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) in mice and rats . **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.56, n.9, p.1179-1184, 2004.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5 ed., Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan S.A., 1994. 387p.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4ed. Editora: Universidade UFRGS/UFSC. 2002.

SIMÕES, C. M. O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2003. p.467-495.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER. V. **Óleos Essenciais**. In **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis. Universidade UFRGS/UFSC, 2000.

SINGH, B.; SOOD, R. P.; SINGH, V. Chemical composition of *Tagetes minuta* L. oil from Himachal Pradesh (Índia). **Journal Essential Oil Research. Wheaton**, v.4, p.525-526. Sept-Oct., 1992.

SOUZA, C. A. S.; AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M. Atividade antimicrobiana de *Tagetes minuta* L. Compositae (Chinchilho) frente à bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** Brasil, 2000.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. Nova Odessa. SP: Instituto Plantarum. 2005.

SPITZER, V.; SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ªed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFC. p.467-495. 1102p. 2004.

STUART, K. L. Alkaloids from *Croton humilis*. **Phytochemistry** v.10, e.6, p.460-462, 1971.

TERESCHUK, M. L.; RIERA, M. V; CASTRO, G. R. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. **Journal of Ethnopharmacol**, Irlanda, v.6, cap.3, p.227-232, 1997.

TONDOLO, J. S. M. **Atividade anestésica em robalos-peva (*Centropomus parallelus*) e caracterização química do óleo essencial das folhas de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae)**, 75 f., 2011. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria.

TORRES, A. M. et al. Examen del aceite esencial de *Nectandra angustifolia* (Schrad.) Nees & Mart. ex Nees. **Univ. Nac. Nordeste Comun. Cient. Technol.**, e.13, 2005.

TÔRRES, A. R. et al. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.15, p.373-380, 2005.

TYRREL, M. H. Evolution of natural flavor development with the assistance of modern technologies. **Fd. Tech.**, p.68-72, January 1990.

VALGAS, C. et al. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products, **Braz. J. Microbiol.**, v.38, n.2, p.369-380, 2007.

VALLEY, P. S. M.; SCORA, C. A. R. W. Phytochemistry of *Nectandra umbrosa* Berries. Cloudforest Food of the Resplendent Quetzal. **California Avocado Society. Yearbook**, v.83, p.163-171, 1999.

VENEGAS, F. H.; SEGURA, C. D.; VÁZQUEZ, C. B. Antiinflammatory Activity of aqueous Extract of *Calea zacatechichi*. **Proc. West. Pharmacological Society**, v.45, p.110-111, 2002.

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol. From discovery to clinic. **Journal for Ethnopharmacology**, v.51, p.239-254, 1996.

WEBSTER, G. L. Realignment in American Croton (Euphorbiaceae). **Novon**, v.2, p.269-273, 1992.

WOOLF, A. Essential oil poisoning. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, v.37, p.721-727, 1999.

WURDACK, K. J.; HOFFMANN, P.; CHASE, M. W. Molecular phylogenetics analysis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae sensu stricto) using plastid rbcL and trnL-F DNA sequences. **American Journal of Botany**, v.92, p.1397-1420, 2005.

YAMADA, M. Germacranolides from *Calea urticifolia*. **Phytochemistry**, v.65, p.3107-3111, 2004.