

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

***POIRETIA LATIFOLIA E POIRETIA TETRAPHYLLA:*
ESTUDO DOS ÓLEOS VOLÁTEIS E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS PRELIMINARES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carla Porto da Silva

Santa Maria, RS, Brasil

2005

***POIRETIA LATIFOLIA* E *POIRETIA TETRAPHYLLA*:
ESTUDO DOS ÓLEOS VOLÁTEIS E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS PRELIMINARES**

por

Carla Porto da Silva

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado 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
Mestre em Química.

Orientador: Ademir Farias Morel

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado


**POIRETIA LATIFOLIA E POIRETIA TETRAPHYLLA:
ESTUDOS DOS ÓLEOS VOLÁTEIS E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS PRELIMINARES**

elaborada por
Carla Porto da Silva

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:


Ademir Farias Morel, Dr.
(Presidente/Orientador)


Eduardo Miranda Ethur, Dr. (UNIVATES)


Ubiratan Flores da Silva, Dr. (UPF)

Santa Maria, 21 de janeiro de 2005.

*Àqueles que não deixaram de acreditar em
seus sonhos, sempre confiantes na justiça
divina e na boa vontade dos homens.*

Aos meus queridos pais José Luiz e Maria Júlia, que nunca mediram esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos e objetivos, me ajudando e apoiando em todos os momentos de minha vida....

Amo muito vocês!

Ao meu querido irmão Tiago, que sempre esteve ao meu lado, muito obrigado pelo amor e pelo carinho. E ao meu irmão Adriano (*in memoriam*), onde quer que esteja, sei que está sempre torcendo por mim...

Amo muito vocês!

Ao Eduardo, que sempre foi muito mais que meu namorado, mas um grande amigo e companheiro de todos os momentos.

Agradeço todo teu amor, carinho e paciência.

Te amo muito.

Ao Prof. Dr. Ademir Farias Morel, meu mais sincero agradecimento e admiração, pela grandeza do trabalho que desenvolve, como orientador e docente, pela enorme contribuição na minha formação como profissional na área. Agradeço imensamente, não apenas pela orientação, mas pela amizade e confiança depositada em mim.

À Prof^ª. Dr^ª. Emilia Carolina S. M. Dessoy, que nos deixou no dia 26 de agosto de 2003, uma grande mãe e amiga de todos no NPPN que, para mim foi um grande exemplo de perseverança, vida e alegria, agradeço todo o seu carinho, compreensão e incentivo, sentiremos sempre a sua falta!

AGRADECIMENTOS

As minhas amigas Adriana Flach e Caroline Z. Stüker pela maravilhosa amizade e por toda a ajuda que me foi prestada.

Aos colegas e amigos: Eduardo M. Ethur, Ubiratan Flores, Vinicius Ilha, Gilvan O. C. Dias, Larissa V. Becker, pela valiosa contribuição na realização deste trabalho.

Aos amigos Simone S. Amaral, Sabrina Schirmer, Estela Crespan, Márcio W. Paixão pela amizade e companheirismo durante todo o curso de graduação e mais ainda, durante o mestrado.

Aos demais colegas de laboratório: Anderson S. Mallmann, Euclésio Simionatto, Vinicius Londero, Irene M. Alles, Ilmar Graebner, Marco Aurélio Mostardeiro, Wellington de Abreu Gonzaga, Enrique L. Larghi, Andréia Webber, Graciela Maldaner, pela convivência e contribuição durante a realização deste trabalho.

Aos secretários do curso de Pós-Graduação em Química: Ademir e Valéria pela amizade e eficientes serviços.

À Professora Anita J. Marsaioli do Instituto de Química da Unicamp, pelos espectrometros de massas concedidos.

Aos Órgãos financiadores: CNPq e FAPERGS, pelas concessões das bolsas e das verbas, que viabilizaram a execução deste trabalho.

Aos demais amigos e parentes que sempre me incentivaram e aceitaram a minha ausência.

RESUMO

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

***POIRETIA LATIFOLIA* E *POIRETIA TETRAPHYLLA*:
ESTUDO DOS ÓLEOS VOLÁTEIS E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS PRELIMINARES**

AUTORA: CARLA PORTO DA SILVA
ORIENTADOR: ADEMIR FARIAS MOREL

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 21 de janeiro de 2005.

Os óleos essenciais das partes aéreas de folhas e flores de *Poiretia latifolia* e *Poiretia tetraphylla* foram analisados por CG, CG/EM e Cromatografia Gasosa Enantiosseletiva (CGE), sendo que foram identificados quarenta e cinco componentes destes óleos voláteis.

Os componentes principais dos óleos voláteis de *P. latifolia*, ricos em monoterpenos, foram a carvona (50-69%), o limoneno (13-24%) e a *trans*-dihidrocarvona (8-18%).

O óleo volátil das folhas de *P. tetraphylla* teve uma composição dominada por sesquiterpenos, onde o nerolidol-E (17-30%), o β -cariofileno (5-16%) e o germacreno-D (3-9%) foram os componentes principais.

Os óleos voláteis de *P. latifolia* mostraram uma atividade frente a *Artemia salina* bastante significativa ($LC_{50} = 67 - 85 \mu\text{g mL}^{-1}$), exibindo também atividade antimicrobiana contra algumas bactérias gram-positivas e gram-negativas, e alguns fungos, enquanto o óleo volátil de folhas de *P. tetraphylla* foi inativos para estes ensaios.

Palavras-chaves: Óleos voláteis, *Poiretia*, Carvona.

ABSTRACT

***POIRETIA LATIFOLIA* E *POIRETIA TETRAPHYLLA*:
STUDY OF THE ESSENTIAL OILS AND
PRELIMINARY BIOLOGICAL ACTIVITY**

AUTHOR: CARLA PORTO DA SILVA

ACADEMIC ADVISOR: ADEMIR FARIAS MOREL

The essential oils from the aerial parts of leaves and flowers of *Poiretia latifolia* and *Poiretia tetraphylla*, were analysed by GC, GC/MS and Enantioselective Gas Chromatography (EGC). Forty five constituents were identified from the essential oils.

The major constituents of the essential oils of *P. latifolia*, dominated by monoterpenos, were carvone (50-69%), limonene (13-24%) and *trans*-dihidrocarvone (8-18%).

The essential oil from leaves of *P. tetraphylla* was dominated by sesquiterpenes, where nerolidol-E (17-30%), β -cariofilene (5-16%) and germacrene-D (3-9%) were the major constituents.

The essential oils from *P. latifolia* shows activity against brine shrimp assay ($LC_{50} = 67 - 85 \mu\text{g mL}^{-1}$), and exhibited antimicrobial activity against some gram-positive and gram-negative bacteria, and some yeasts, while the essential oil from leaves of *P. tetraphylla* was inactive.

KEYWORDS: Essential oils, *Poiretia* and Carvone.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
ÍNDICE	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ESQUEMAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xvi
I. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
AS PLANTAS MEDICINAIS E AROMÁTICAS	1
II. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. FAMÍLIA LEGUMINOSAE.....	4
2.1.1. O gênero <i>Poiretia</i> VENT. (Leguminosae- Papilionoideae)	6
2.2. ÓLEOS VOLÁTEIS.....	11
2.2.1 Aplicações dos Óleos Voláteis	14
2.3 BIOSÍNTESE DE MONOTERPENOS EM PLANTAS	15
2.3.1 Biossíntese dos Monoterpenos	16
2.4 O MONOTERPENO CARVONA	23
2.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA ÓLEOS VOLÁTEIS.....	26
2.5.1 Cromatografia Gasosa	26
2.5.2 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas.....	27
2.5.3 CROMATOGRAFIA GASOSA ENANTIOSELETIVA	28
III. PROSPECÇÃO DE COMPOSTOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS	29
3.1 ÓLEOS VOLÁTEIS E SUAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS	30
3.2 MODO DE AÇÃO ANTIMICROBIANA	32
3.3 TESTES “ <i>IN VITRO</i> ” DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	35
3.4 Determinação de Atividade Antimicrobiana	37
3.4.1 Determinação da Atividade Antimicrobiana pelo Método de Bioautografia.	38
3.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo Método de Microdiluição.	40
3.5 DETERMINAÇÃO DE TOXICIDADE “ <i>IN VIVO</i> ”	41
3.5.1 Teste de letalidade por <i>Artemia salina</i>	41
3.6 TESTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	42
3.6.1 Método do radical livre DPPH	43
IV. PARTE EXPERIMENTAL	45
4.1 GERAL:	45
4.1.1 Ressonância Magnética Nuclear.....	45
4.1.2 Espectrometria de Massas	45
4.1.3 Cromatografia Gasosa	45
4.1.4 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	46
4.1.5 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)	46
4.1.6 Solventes e reagentes purificados.....	46
4.2 COLETA DE MATERIAL VEGETAL E IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS	47
4.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO VOLÁTIL DE <i>P. LATIFOLIA</i> E <i>P. TETRAPHYLLA</i>	47
4.4 ANÁLISE DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DAS ESPÉCIES DE <i>POIRETIA</i>	48

4.6 AMOSTRAS PARA CROMATOGRAFIA GASOSA.....	49
4.7 ISOLAMENTO DO MONOTERPENO CARVONA	50
4.8. PREPARAÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS RAÍZES DE <i>P. LATIFOLIA</i> NATIVA	50
4.9. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA “ <i>IN VITRO</i> ”	50
4.9.1 Meios de cultura empregados.....	51
Meio caldo caseína de soja: meio utilizado em ensaios de concentração inibitória mínima no cultivo de bactérias.	52
4.9.2 Preparo das suspensões microbianas (inóculo).....	52
4.9.3 Determinação da Atividade Antimicrobiana pelo Método de Bioautografia.	53
4.9.4 Determinação da CIM pelo método de microdiluição.....	53
4.10 DETERMINAÇÃO DE TOXIDADE “ <i>IN VIVO</i> ”.....	54
4.10.1 Teste de letalidade por <i>Artemia salina</i>	54
4.11 TESTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	55
4.11.1 Método do radical livre DPPH	55
V. ESTUDO DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DAS ESPÉCIES DE <i>POIRETIA</i>	56
5.1. COLETA DO MATERIAL	56
5.2 ESTUDO DO ÓLEO VOLÁTIL DE FOLHAS E FLORES DE <i>POIRETIA LATIFOLIA</i>	56
5.2.1 Determinação dos constituintes do óleo das folhas de <i>P. latifolia</i> nativa.....	56
5.2.2 Estudo do óleo volátil de flores de <i>Poiretia latifolia</i> nativa.	64
5.2.3 Determinação dos constituintes do óleo das folhas de <i>P. latifolia</i> cultivada.....	67
5.2.3 Determinação dos constituintes do óleo das flores de <i>P. latifolia</i> cultivada.	73
5.3 ESTUDO DO ÓLEO VOLÁTIL DE <i>POIRETIA TETRAPHYLLA</i> VOG.	75
5.3.1 Determinação dos constituintes do óleo de folhas e talos de <i>P. tetraphylla</i>	75
5.4 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO ENANTIOMÉRICA DE TERPENOS PRESENTES NOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE <i>P. LATIFOLIA</i>	81
5.4.1 Determinação enantiomérica de terpenos no óleo volátil de <i>P. latifolia</i> nativa	84
5.4.2 Determinação enantiomérica de terpenos no óleo volátil de <i>P. latifolia</i> cultivada	87
VI. ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA PRELIMINAR DE <i>POIRETIA LATIFOLIA</i> BRIQ. E <i>POIRETIA TETRAPHYLLA</i> VOG.....	92
6.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA “ <i>IN VITRO</i> ”.	92
6.1.1. Determinação da Atividade Antimicrobiana pelo Método de Bioautografia.	92
6.1.2. Determinação da CIM pelo Método de Microdiluição.....	95
6.2. DETERMINAÇÃO DE TOXIDADE “ <i>IN VIVO</i> ”	99
6.2.1. Teste de letalidade por <i>Artemia salina</i>	99
6.3 TESTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO RADICAL LIVRE DPPH	100

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Principais constituintes de alguns óleos voláteis com propriedades antimicrobianas.	31
TABELA 2. Termos usados em testes de atividade antimicrobiana.	36
TABELA 3. Composição dos óleos voláteis das folhas de <i>P. latifolia</i> nativa.	58
TABELA 4. Deslocamentos químicos de RMN de H e ¹³ C da carvona (31), em CDCl ₃ .	61
TABELA 5. Composição dos óleos voláteis das flores de <i>P. latifolia</i> nativa.	65
TABELA 6. Variação da composição dos óleos voláteis das folhas de <i>P. latifolia</i> cultivada.	67
TABELA 7. Composição do óleo volátil das flores de <i>P. latifolia</i> cultivada.	73
TABELA 8. Composição dos óleos voláteis de talos e folhas de <i>P. tetraphylla</i> nativa.	76
TABELA 9. Determinação da quantidade inibitória mínima dos óleos voláteis e monoterpenos de <i>P. latifolia</i> e <i>P. tetraphylla</i> .	93
TABELA 10. Determinação da quantidade inibitória mínima das frações do extrato etanólico das raízes de <i>Poiretia latifolia</i> nativa.	95
TABELA 11. Resultados de CIM, CBM e CFM para os óleos de <i>P. latifolia</i> e <i>P. tetraphylla</i> .	96
TABELA 13. Resultados de CBM, CBM e CFM para os terpenos puros, em mg mL ⁻¹ .	98
TABELA 14. Concentração letal das amostras frente a <i>Artemia salina</i> .	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplo de estruturas de monoterpenos regulares e irregulares.....	17
Figura 2. Biossíntese do ácido crisantêmico	20
Figura 3. A rota biossintética do mevalonato.....	22
Figura 4. Fórmula estrutural do monoterpeno carvona.....	23
Figura 5. Fórmula estrutural dos constituintes antimicrobianos de alguns óleos voláteis.....	32
Figura 6. Localização e mecanismos na célula microbiana que podem ser sítios de ação dos componentes de óleos voláteis.....	33
Figura 7. Colocação de CCD em placa de Petri para realização de bioautografia.....	39
Figura 8. Diluições em série para determinação de CIM.....	40
Figura 9. Aparelho de Clevenger modificado, utilizado na extração do óleo essencial.....	48
Figura 10. Perfil cromatográfico do óleo das folhas de <i>P. latifolia</i> nativa na primavera.....	57
Figura 11. Perfil cromatográfico do óleo das folhas de <i>P. latifolia</i> nativa no verão.....	57
Figura 12. Perfil cromatográfico do óleo das folhas de <i>P. latifolia</i> nativa no outono.....	58
Figura 13. Espectro de massas do componente majoritário do óleo das folhas de <i>P. latifolia</i> nativa.	60
Figura 14. Espectro de RMN de H da carvona (31).....	60
Figura 15. Expansão do espectro de RMN de H da carvona (31), entre 1,00 e 2,6 ppm.....	61
Figura 16. Espectro de RMN de ¹³ C da carvona (31).....	61
Figura 17. Espectro de massas da <i>trans</i> -dihidrocarvona encontrada no óleo das folhas de <i>P.</i> <i>latifolia</i> nativa.....	62
Figura 8. Espectro de massas do limoneno encontrado no óleo das folhas de <i>P. latifolia</i> nativa. ...	62
Figura 19. Representação gráfica da variação sazonal dos três principais constituintes do óleo das folhas de <i>P. latifolia</i> nativa.....	63
Figura 20. Perfil cromatográfico óleo volátil de flores de <i>P. latifolia</i> nativa.....	64
Figura 21. Perfil cromatográfico óleo volátil de folhas de <i>P. latifolia</i> cultivada.....	69
Figura 22. Espectro de massas da β-tujona encontrada no óleo das folhas de <i>P. latifolia</i> cultivada, amostra A.....	70

Figura 23. Espectro de massas da α -tujona encontrada no óleo das folhas de <i>P. latifolia</i> cultivada, amostra A.....	70
Figura 24. Perfil cromatográfico do óleo volátil das folhas de <i>P. latifolia</i> cultivada coletada na primavera.....	71
Figura 25. Perfil cromatográfico do óleo volátil das folhas de <i>P. latifolia</i> cultivada coletada no verão	71
Figura 26. Perfil cromatográfico do óleo volátil das folhas de <i>P. latifolia</i> cultivada coletada no outono	72
Figura 27. Representação gráfica da variação sazonal dos principais constituintes do óleo das folhas de <i>P. latifolia</i> cultivada.....	72
Figura 28. Perfil cromatográfico do óleo volátil das flores de <i>P. latifolia</i> cultivada	75
Figura 29. Espectro de massas do nerolidol encontrado no óleo de talos e folhas de <i>P. tetraphylla</i>	77
Figura 30. Perfil cromatográfico do óleo volátil de talos e folhas de <i>P. tetraphylla</i> coletados na primavera.....	78
Figura 31. Perfil cromatográfico do óleo volátil de talos e folhas de <i>P. tetraphylla</i> coletados no verão	78
Figura 32. Perfil cromatográfico do óleo volátil de talos e folhas de <i>P. tetraphylla</i> coletados no outono.....	79
Figura 33. Representação gráfica da variação sazonal dos principais constituintes do óleo das folhas de <i>P. tetraphylla</i>	80
Figura 34. (a) Separação enantiomérica do (+/-)- α -pineno (2) e (b) determinação da ordem de eluição com co-injeção de (+)- α -pineno.	82
Figura 36. (a) Separação enantiomérica do (+/-)-carvona (31) e (b) determinação da ordem de eluição com co-injeção de (-)-carvona.	83
Figura 42. Separação enantiomérica da mistura de padrões racêmicos: de (+/-)- α -pineno, (+/-)-limoneno e (+/-)-carvona.....	83
Figura 37. Cromatograma do óleo volátil das folhas de <i>P. latifolia</i> nativa, coletadas na primavera (A)	84
Figura 38. Identificação enantiomérica dos componentes do óleo volátil das folhas de <i>P. latifolia</i> nativa (A), com co-injeção da mistura racêmica dos padrões de terpenos.....	85

Figura 39. Cromatograma do óleo volátil das folhas de <i>P. latifolia</i> nativa, coletadas no verão	85
Figura 40. Identificação enantiomérica dos componentes do óleo volátil das folhas de <i>P. latifolia</i> nativa (B), com co-injeção da mistura racêmica dos padrões de terpenos.	86
Figura 41. Cromatograma do óleo volátil das flores de <i>P. latifolia</i> nativa, coletadas em 2002 (B).	86
Figura 42. Identificação enantiomérica dos componentes do óleo volátil das flores <i>P. latifolia</i> nativa (B), com co-injeção da mistura racêmica dos padrões de terpenos.	87
Figura 43. Cromatograma do óleo volátil das folhas de <i>P. latifolia</i> cultivada, coletadas logo após o transplante (A).	88
Figura 44. Identificação enantiomérica dos componentes do óleo volátil das folhas <i>P. latifolia</i> cultivada (A), com co-injeção da mistura racêmica dos padrões de terpenos.	88
Figura 45. Cromatograma do óleo volátil das folhas de <i>P. latifolia</i> cultivada, coletadas no verão (C).....	89
Figura 46. Identificação enantiomérica dos componentes do óleo volátil das flores <i>P. latifolia</i> cultivada (C), com co-injeção da mistura racêmica dos padrões de terpenos.	89
Figura 47. Cromatograma do óleo volátil das flores de <i>P. latifolia</i> cultivada, coletadas realizada em 2003 (A).....	90
Figura 48. Identificação enantiomérica dos componentes do óleo volátil das flores <i>P. latifolia</i> cultivada (A), com co-injeção da mistura racêmica dos padrões de terpenos.	90
Figura 49. Teste de bioautografia do óleo volátil de <i>P. latifolia</i> nativa (PL), <i>R</i> -carvona e <i>S</i> -carvona frente ao fungo <i>Candida albicans</i>	94
Figura 50. Ensaios de Bioautografia realizados com as frações do extrato etanólico da raiz de <i>Poirertia latifolia</i> nativa.....	95
Figura 51. Placas contendo os CIMs de algumas amostras analisadas.	97
Figura 52. Resultado do teste do DPPH para os óleos voláteis.....	100
Figura 53. Resultado do teste do DPPH para as frações do extrato etanólico de <i>P. latifolia</i> nativa.	100

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Biossíntese de isoprenóides e o papel das prenil-transferases em plantas superiores.	17
Esquema 2. Membros representativos de varias subfamílias de monoterpenos.....	19
Esquema 3. Rota biossintética de monoterpenos no metabolismo da hortelã-pimenta.....	20
Esquema 4. Rota para a biossíntese de (-)-carvona a partir de precursores primários isopentenil-difosfato (IPP) e dimetil-alil-difosfato (DMAPP).	25
Esquema 5. Representação da reação de redução do TTC, com a formação da formazana.....	39
Esquema 6. Representação esquemática da reação do radical livre DPPH com a molécula doadora de H, dando origem a sua forma reduzida, DPPH-H.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

OMS	Organização Mundial da Saúde
IPP	isopentenil difosfato
DMAPP	dimetilalil difosfato
GPP	geranil difosfato
MVA	mevalonato
DXP	1-deoxi-D-xilose-5-fosfato
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
RMNH	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
EM	Espectrometria de Massas
IE	impacto de elétrons
eV	elétron-Volt
CGE	Cromatografia Gasosa Enantiosseletiva
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
MHz	Mega Hertz
TMS	tetrametil silano
δ	deslocamento químico
IK	Índice de Kovats
CCSF	Coluna Capilar de Sílica Fundida
DIC	detector de Ionização de Chama
ATCC	American Type Culture Collection
TCC	cloreto de trifenil tetrazólio
DMSO	dimetil sulfóxido
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
Rf	Fator de Retenção
<i>m/z</i>	Relação massa/carga

I. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

AS PLANTAS MEDICINAIS E AROMÁTICAS

O uso de plantas medicinais pelo ser humano é tão antigo quanto as civilizações, sendo encontrado em todas as populações, em todos os grupos étnicos conhecidos. No início dos tempos, a fitoterapia representava a principal forma terapêutica conhecida. A partir dela, foram descobertos diversos medicamentos na medicina tradicional¹.

Com base na evolução histórica do uso de plantas medicinais e aromáticas, a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 1978, passou a reconhecer a fitoterapia como terapia alternativa de eficácia comprovada. Iniciaram-se então programas nacionais em instituições, visando à pesquisa e o desenvolvimento na área de plantas medicinais e aromáticas².

De acordo com a OMS, 80% da população mundial faz uso de alguma planta medicinal ou aromática, dos quais 30% são por indicação médica. Devido ao crescente interesse da população por terapias alternativas e produtos naturais, atualmente o mercado de plantas medicinais e aromáticas vem crescendo de forma expressiva em todo o mundo².

O mercado mundial de fitoterápicos movimenta cerca de US\$ 22 bilhões por ano e vem seduzindo a cada ano mais adeptos nos países desenvolvidos. Em 2000, o setor faturou US\$ 6,6 bilhões nos EUA e US\$ 8,5 bilhões na Europa, sendo a Alemanha, de longe, o maior mercado mundial de fitoterápicos. O extrato padronizado de *Ginkgo biloba* é hoje um dos fitoterápicos mais vendidos no mundo e no Brasil. O país exporta cerca de US\$ 7 milhões em extratos vegetais de alcaçuz, aloés, bardana, catuaba, ipeca e quina. Por outro lado, importa uma quantidade considerável de hormônios esteroidais, produtos cosméticos de fonte natural; um verdadeiro contra-senso para uma nação que possui uma das maiores populações vegetais do planeta³.

¹ MARTINS, E.R. **Plantas Medicinais**, Viçosa, Minas Gerais, Universidade de Viçosa, p.220, 1994.

² VIEIRA, L.C. **Fitoterapia da Amazônia**: manual de plantas medicinais, 2ª ed., São Paulo, Agronômica Ceres, p.347, 1992.

³ FERNANDES, L.R.; ANTUNES, A.S. **Informações estratégicas sobre Plantas Medicinais obtidas a partir de bases de dados em Linha Mimeo**. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.

Um problema grave na comercialização de fitoterápicos no Brasil, ou a possibilidade de exportação é a falta do *status* de medicamento ético que lhe garanta eficácia, segurança e qualidade, padrões estes mensurados em bases científicas para a segurança do usuário⁴. Muitos exemplos da biota brasileira poderiam ser citados, entretanto, a maioria das plantas medicinais comercializadas no Brasil são introduzidas. Assim, as plantas medicinais endêmicas ainda são pouco conhecidas e se constituem em um fascinante assunto de pesquisa acadêmica e de desenvolvimento⁵.

Mais recentemente, o estudo das plantas medicinais e aromáticas está sendo abordado também sob o enfoque agrícola, servindo como alternativa na produção de pequenos, médios e grandes produtores. Já existe no Brasil, principalmente na Região Sul, cooperativas de pequenos produtores de plantas medicinais, em especial produtores de camomila, que estão colocando seu produto no mercado interno e em alguns países do Mercosul, dentro dos melhores padrões de qualidade⁶.

É unanimidade entre químicos e farmacólogos brasileiros de reconhecida expressão internacional, que os estudos com plantas medicinais ainda não receberam no Brasil, a atenção que o tema merece das agências financiadoras, embora já existam muitos pesquisadores qualificados nestas áreas. Até o presente momento, não houve um processo coordenado de todas as áreas interessadas visando o desenvolvimento de fármacos a partir de plantas⁵.

⁴SIANI, A.C.; GILBERT, B. **Riopharma**, n.18, 2000.

⁵PINTO, A.C., et al. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, 45-61, 2002.

⁶MING, L.C., et al. **Plantas medicinais aromáticas e condimentares: Avanços da pesquisa agronômica**. UNESP, Botucatu, SP, v. 2, p.129-132, 1998.

De acordo com o contexto dos trabalhos desenvolvidos no Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais (NPPN), priorizando a pesquisa de óleos voláteis de plantas aromáticas do Sul do Brasil^{7,8,9} foram traçados os principais objetivos deste trabalho:

- ◆ Extração e isolamento dos constituintes voláteis de espécies do gênero *Poiretia* encontradas no Rio Grande do Sul: *Poiretia latifolia* Vogel e *Poiretia tetraphylla* Bukart.;
- ◆ Determinação da composição dos óleos voláteis destas espécies, por cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas;
- ◆ Determinação da constituição enantiomérica de alguns componentes quirais dos óleos voláteis obtidos utilizando técnicas de cromatografia gasosa enantiosseletiva;
- ◆ Realização de testes de atividade biológica destes óleos essenciais e de substâncias isoladas, tais como, atividade antimicrobiana, citotóxica e antioxidante;
- ◆ Análises sazonais da composição dos óleos voláteis das espécies estudadas bem como das alterações de constituição entre espécies de diferentes regiões.

⁷MOREL A. F., et al. Volatile constituent's composition of *Blepharocalix salicifolius* leaf oil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, p. 45-48, 1999.

⁸MOREL A. F., et al. Chemical analysis and antifungal activities of the essential oil of *Calea clematidea* (Asteracea). **Planta Medica**, v. 68, p. 836-838, 2002.

⁹MOREL A. F., et al. Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Planta Medica**, v. 69, p. 773-775, 2003.

II. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. FAMÍLIA LEGUMINOSAE

Leguminosae Adans. é uma família vasta, cosmopolita e geologicamente antiga. Está ausente apenas nas regiões ártica e antártica, sendo pobremente representada na Nova Zelândia. Os trópicos são particularmente ricos em espécies herbáceas e lenhosas dessa família¹⁰. É de grande importância para a flora amazônica, cabendo-lhe o primeiro lugar entre os vegetais lenhosos, quanto ao número de gêneros e espécies, sendo ainda “uma das famílias mais naturais do sistema botânico¹¹”. É a terceira maior família entre as plantas com flores (fanerógamas) de acordo com Lima e col. (1980)¹². Sua importância econômica é muito diversificada, sendo utilizada desde a alimentação humana e animal até na produção de corantes, óleos, perfumes, inseticidas, e ainda apresenta uso medicinal, agrônomo (enriquecimento de solos), ornamental e, principalmente, para produção de madeiras nobres e valiosas usadas na marcenaria, entalhadura e construções em geral¹³. Lima e col. (1980)¹², relataram que as leguminosas vêm sendo apontadas como uma das principais fontes para a produção de proteína vegetal, particularmente para os países subdesenvolvidos.

A família, segundo Judd e col. (1999)¹⁴, está dividida em três subfamílias (Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae) com aproximadamente 18.000 espécies, distribuídas em 619 gêneros, sendo sua grande maioria oriunda da flora brasileira. Suas espécies apresentam hábito muito variado, desde grandes árvores, arbustos, ervas e trepadeiras, tanto escandentes como volúveis, encontradas em diferentes ambientes¹⁵. Quase sempre apresentam folhas compostas; filotaxia alterna e sempre com estípulas na base; flores actinomorfas ou zigomorfas, com cálice mais frequentemente gamossépalo, podendo apresentar-se dialissépalo e corola dialipétala, androceu geralmente com 10 estames, podendo apresentar menor ou maior número, livres ou soldados; ovário com

¹⁰BUKART, A. **Las Leguminosas argentinas silvestres y cultivadas**. ACNE Agency, Buenos Aires. 560p., 1952.

¹¹DUCKE, A. Notas sobre a flora neotropical II. **Bol. Tec. Inst. Agron. Norte**, n.18, 248p., 1949.

¹²LIMA, H.C.de. Revisão taxonômica do gênero *Vataireopsis* Ducke (Leg.Fab.). **Rodriguésia**, v. 32, n.54, p. 21-40, 1980.

¹³FERREIRA, G. C., HOPKINS, M.J.G., SECCO, R.S. Contribuição ao conhecimento morfológico das espécies leguminosae comercializadas no estado do Para. **Acta Amazônica**, v. 34, n.2, p. 219-232, 2004.

¹⁴JUDD, W. S., et al. **Plant Systematics: a phylogenetic approach**. Ed. Sinauer, USA, 464p. 1999.

¹⁵JOLY A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. Ed. Nacional, São Paulo, SP, 777p. 1993.

inserção acima das peças florais, com um ou muitos óvulos; o fruto em geral é um legume, porém, podem apresentar outros tipos como lomento, folículo e sâmara¹⁶.

Estudos fitoquímicos de espécies de Leguminosae têm levado ao isolamento de flavonóides, taninos e alcalóides. Essas são ricas em alcalóides quinolizidínicos que são uma característica peculiar, principalmente da subfamília Papilionoideae, na qual mais de 200 destes alcalóides já foram identificados¹⁷.

Os flavonóides também são encontrados em toda a família Leguminosae, sendo que os isoflavonóides são restritos a subfamília Papilionoideae. As catequinas e proantocianinas ou galoilcatequinas ocorrem em todas as três subfamílias, sendo que nas subfamílias Caesalpinioideae e Mimosoideae são encontradas em maior quantidade¹⁸. Alguns flavonóides isolados de Leguminosae, como a rutina, são utilizados como antioxidantes e no tratamento da fragilidade capilar¹⁹.

Entre os terpenóides, todas as classes de terpenos tem sido encontradas em Leguminosae, como os triterpenos e saponinas esteróides (incluindo glicosídeos cardiotônicos em *Securigera* e *Corinilla*, ambas Loteae). As Leguminosae também são ricas em óleos voláteis, tendo como principais constituintes os monoterpénóides²⁰.

A subfamília Papilionoideae, na qual encontram-se as espécies alvo deste estudo, é bastante vasta com 750 gêneros e mais de 18.000 espécies. Vários tipos de alcalóides, aminoácidos não protéicos, amins, flavonóides, isoflavonóides, cumarinas, fenilpropanóides, antraquinonas, sesqui-, di- e tri-terpenos, inibidores de protease e lecitinas tem sido descritas nesta subfamília¹⁸.

¹⁶Barroso, G.M., et al. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Imprensa Universitária, Minas Gerais, v. 2, 377p, 1991.

¹⁷KITE, G.C., et al. The use of hyphenated techniques in comparative phytochemical studies of legumes. **Biochemical Systematics and Ecology**, n. 31, p. 813-843, 2003.

¹⁸WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, n.64, p. 3-19, 2003.

¹⁹LEITÃO, G.G., et al. Avaliação da atividade antioxidante do extrato e frações de *Pseudopiptadenia contorta* (Leguminosae-Mimosoideae). **23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Livro de Resumos, v. único, p. 753, 2000.

²⁰SEIGLER, D.S. Phytochemistry of *Acácia-sensu lato*. **Biochemical Systematics and Ecology**, n. 31, p. 845-873, 2003.

2.1.1. O gênero *Poiretia* VENT. (Leguminosae- Papilionoideae)

Poiretia juntamente com os gêneros *Aeschynomene*, *Arachis*, *Chaetocalyx*, *Stylosanthes* e *Zornia*, constituem a tribo AESCHYNOMENEAE, no Rio Grande do Sul.

O gênero *Poiretia* foi dedicado ao botânico francês Juan Poiret (1755-1834). As espécies distribuem-se pelas regiões equatoriais e subtropicais das Américas, sendo seu limite à Argentina, na região da Patagônia. Ocorrem também nas Grandes Antilhas, nas Guianas e no Chile. São plantas megatérmicas bem adaptadas a regiões de clima frio. No Brasil ocorrem quase todas as espécies deste gênero, sendo algumas delas endêmicas²¹.

Segundo Muller (1984)²², o gênero *Poiretia* está representado no Brasil por doze espécies, dividido em duas seções: Seção *Poiretia* Vent. e Seção *Virgata* C. Muller, a primeira constituída por uma única espécie polimorfa *Poiretia punctata* (Willd.) Desv. ex. Rudd. e a segunda por onze espécies distintas.

São espécies campestres que ocorrem preferencialmente em solos com vegetação herbácea e/ou arbustiva²³. O florescimento inicia-se na primavera e atinge seu máximo no verão, declinando no outono, sendo praticamente nulo no inverno. A maior floração coincide com os períodos de maior intensidade luminosa²².

No Estado ocorrem em ambientes abertos, correspondendo a áreas de campo, sempre em manchas e sendo utilizadas como plantas medicinais, contra afecções estomacais, já tendo sido referidas inclusive como inseticidas sem, contudo haver estudos farmacológicos das mesmas; parecem não ser apreciada pelo gado, não existindo também estudos sobre seu potencial forrageiro²⁴.

Desde a época da criação do gênero *Poiretia* (Ventenat, 1807)²⁵, dos trabalhos efetuados por Rudd (1972)²⁶, e dos mais recentes realizados por Muller (1984)²² e Janke (1988)²⁴, as atenções dispensadas ao gênero foram poucas e normalmente relacionadas com

²¹BURKART, A. Estudios sistemáticos sobre las leguminosas-hedisareas de la Republica Argentina y regiones adjacentes. **Darwiniana**, Buenos Aires, v. 3, n.2, p.222-228, 1939.

²²MÜLLER, C. Revisão do gênero *Poiretia* Vent. (Leguminosae) para o Brasil. Tese (Mestr-Biol. Veg.) Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas, 135p., 1984.

²³RAMBO, B. S. J. Estudo comparativo das leguminosas riograndenses. **An. Bot. Herb. "Barbosa Rodrigues"**, Itajaí, v.3, n.5, p. 107-184, 1953.

²⁴JANKE, H., OLIVEIRA, M.L.A.A., SIQUEIRA N.C.S. O gênero *Poiretia* VENT. no Rio Grande do Sul – taxonomia e aspectos farmacognósticos. **Iheringia, Série Botânica**, Porto Alegre, v. 38, p.43-66, 1988.

²⁵VENTENAT, N. Notice sur les plantes qui seront publiees dans les cinq dernieres livraison de l'ouvrage intitulee "Choix des plantes". **Memoires de la Classe des Sciences, Mathematique et Physique de l'Institut National de France**, Paris, v.1, p.1-6, 1807.

²⁶RUDD, V.E. A new variety of *Poiretia latifolia* and a brief resume of the genus *Poiretia* Vent. (Leguminosae). **Phytlogia**, Plainfield, v. 23, n. 1, p.141-148, 1972.

a descrição de uma nova espécie. Desta forma, a falta de maiores conhecimentos das espécies do gênero, faz com que a bibliografia específica sobre este seja mínima, dificultando principalmente a sua identificação e estudos posteriores.

A literatura fitoquímica sobre as espécies pertencentes ao gênero *Poiretia* é também extremamente escassa. Um dos estudos encontrados foi realizado por Janke e col. (1988)²⁴, que efetuou uma análise farmacognóstica preliminar de compostos fixos e voláteis de *Poiretia latifolia* e *Poiretia tetraphylla* do Rio Grande do Sul. O outro trabalho vem sendo desenvolvido na Bahia, por Martins e Guaré Cruz^{27,28}, no estudo de óleos voláteis de *Poiretia bahiana* C. Muller, que apresentam como constituintes majoritários os monoterpenos umbellulona e sabineno.

***Poiretia latifolia* Vog.²⁹**

Subarbusto a arbusto ereto de até 1,50 m de altura, rizomatoso, pouco ramificado na base, folhas geralmente tetrafoliadas, podendo ocorrer folhas trifoliadas na base. Inflorescências terminais em forma de cacho, flores de até 1,5 cm de comprimento e cerca de 1,0 cm de largura com corola amarela.



Nome popular: erva-de-touro-graúda e limãozinho-do-campo (RS).

²⁷MARTINS, D. et al. Constituintes voláteis de *Poiretia bahiana* e *Zornia flemmingioides* (Leguminosae). In: **26ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA**, 2003, Poços de Caldas, MG. **Anais eletrônicos**. Disponível em <http://www.s bq.org.br/26RASBQ>. Acesso em: 15 nov 2004.

²⁸MARTINS, D. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from *P. bahiana* C. Müller. In: **5th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ESSENTIAL OIL**, 2004, Messina, Italy. CD-ROM.

²⁹LINNAEA 12:54, 1838.

Habitat: ocorre nos campos secos, pedregosos, gramíneos ou arbustivos.

Floração: novembro a fevereiro.

Frutificação: novembro a fevereiro.

Ocorrência no estado: Alto Uruguai, Campanha, Campos de Cima da Serra, Depressão Central, Encosta Inferior do Nordeste, Encosta Superior do Nordeste, Missões e Planalto Médio.

Segundo Muller (1984)²² sua ocorrência se restringe ao Sul do Brasil, nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul e nos países vizinhos, Argentina, Paraguai e Uruguai. Não é muito freqüente no estado, ocorrendo em pequenas manchas.

Segundo Araújo (1940)³⁰ não é espécie com potencial forrageiro, não sendo apreciada pelo gado. De acordo com Muller (1984)²², as folhas de *P. latifolia* Vog. são usadas no Rio Grande do Sul, como aromatizante do chimarrão e, também sendo considerada popularmente como possuidora de propriedades afrodisíacas, quando em infusão. O autor ainda cita a sua utilização por habitantes de Cuiabá e Rosário D'Oeste no Mato Grosso como anti-hemético, sob a forma de ingestão e banho de imersão da infusão de folhas desta espécie. Janke (1988)²⁴ cita o uso da decocção das folhas para afecções estomacais, sendo também as mesmas misturadas à cachaça como aperitivo. Informações etnofarmacológicas obtidas durante esta pesquisa demonstraram ser mais utilizada para problemas de hemorróidas e como afrodisíaca.

A análise farmacognóstica preliminar realizada por Janke e col. (1988)²⁴ de folíolos e caules separadamente de *P. latifolia*, verificou a presença de taninos, flavonóides e traços de saponinas, enquanto que as reações para alcalóides, glicosídeos cardiotônicos, derivados antracênicos livres, triterpenos e/ou esteróides foram consideradas negativas. O autor também realizou a extração do óleo volátil das folhas de *P. latifolia* obtendo um rendimento de 0,5%, sendo realizada apenas uma caracterização do perfil cromatográfico dos componentes deste óleo (hexano/acetato de etila, 9:1), onde observou oito manchas com distintos R_f, duas visíveis em luz ultravioleta (254 nm), entretanto tais constituintes não foram identificados.

³⁰ARAÚJO, A. A. Leguminosas forrageiras do Rio Grande do Sul. Babosas, pega-pegas, urinárias e outras (Estudo da Tribu Hedysareae). **Boletim: Seção de Informação e Propaganda Agrícola. Secretaria do Estado dos Negócios da Agricultura, Indústria e Comércio do RS**, Porto Alegre, v. 80, n. 2, p. 27-32, 1940.

***Poiretia tetraphylla* (Poir.) Burk.³¹**

Erva a arbusto ereto de até 0,8 m de altura, pouco ramificado na base, folhas geralmente tetrafoliadas, inflorescência terminal em forma de cacho e flores com cerca de 0,7 cm de comprimento, 0,8 cm de largura com corola amarela.



Nome popular: erva-de-touro e chá-dos-pampas (RS).

Habitat: ocorre nos campos secos, pedregosos, gramíneos ou arbustivos, podendo ocorrer em terrenos úmidos.

Floração: outubro a abril.

Frutificação: dezembro a abril.

Ocorrência no estado: Campanha, Campos de Cima da Serra, Depressão Central, Encosta do Sudeste, Encosta Inferior do Nordeste, Litoral, Missões, Planalto Médio e Serra do Sudeste.

Ocorre em todas as regiões fisiográficas do Estado excetuando-se o Alto Uruguai, mas de forma escassa, formando pequenas manchas. Segundo Muller (1984)²², no Brasil é mais freqüente nos Estados de São Paulo, Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul e nos países vizinhos, Argentina, Paraguai e Uruguai.

Difere de *P. latifolia*, principalmente pelo menor porte, forma e tamanho dos folíolos e pelo fruto. Burkart²¹ refere-se a *P. tetraphylla* como planta inseticida e ictitóxica,

³¹DARVINIANA, v. 3, p. 224, 1939.

tendo usos medicinais (estomacal, tônica e sudorífera), além de ter observado na região Chaco, Argentina que esta espécie poderia ser tóxica para o gado.

Uma análise farmacognóstica preliminar realizada por Janke e col. (1988)²⁴ de folíolos, caules e flores reunidos de *P. tetraphylla*, verificou a presença de taninos, flavonóides e traços de saponinas, enquanto que as reações para alcalóides, glicosídeos cardiotônicos, derivados antracênicos livres, triterpenos e/ou esteróides foram consideradas negativas. Também realizaram a obtenção do óleo volátil do conjunto de folhas, caule e flores de *P. tetraphylla*, com rendimento de 0,4%, sendo realizada apenas uma caracterização do perfil cromatográfico dos componentes deste óleo (hexano/acetato de etila, 9:1), observando a presença de seis manchas distintas, das quais cinco foram visíveis em luz ultravioleta (254 nm), contudo os constituintes não foram caracterizados.

2.2. ÓLEOS VOLÁTEIS

Os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em vários órgãos das plantas e assim são denominados devido à composição lipofílica que apresentam, quimicamente diferentes da composição glicéridica dos verdadeiros óleos e gorduras. Estão associados a várias funções necessárias à sobrevivência do vegetal em seu ecossistema, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos e predadores, e também na atração de insetos e outros agentes polinizadores³².

Caracterizam-se também por se apresentarem naturalmente com uma grande variedade de constituintes que, de forma quase exclusiva, podem ser divididos em duas classes, com base na biossíntese que lhe deu origem: **(i)** derivados dos terpenóides, formados pela via do mevalonato ou pela via do DXP (1-deoxi-D-xilose-5-fosfato) e **(ii)** compostos aromáticos formados pela via do ácido chiquímico, os fenil propanóides. Sendo que os terpenos representam o grupo mais importante de substâncias químicas secretadas, derivadas do isopreno (unidade ramificada de 5 carbonos) e classificadas de acordo com o número mínimo dessas unidades presentes na molécula³³.

O uso farmacêutico dos óleos voláteis fundamenta-se nas suas propriedades fisiológicas: o perfume e o sabor; o efeito irritante sobre a pele e as mucosas; as propriedades desinfetantes e a ação bactericida. As essências de anis, de funcho, etc. (*Pimpinella anisum*, *Foeniculum vulgare*) são muitas vezes usadas como expectorantes, pois são eliminadas pelos pulmões e desinfetam assim diretamente as vias respiratórias, libertando as mucosidades. São usadas também em gargarejos, inalações e gotas nasais². De um modo geral, os componentes presentes em óleos voláteis aumentam a circulação periférica do corpo, eles alteram o comportamento da circulação sangüínea, do aparelho digestivo, do aparelho urinário, do sistema cardiovascular, do sistema pulmonar e, ainda, a secreção dos hormônios³³.

No organismo humano, as substâncias voláteis exercem um mecanismo muito interessante. Quando aspiramos um óleo volátil, ele é absorvido pelos nervos olfativos, indo diretamente para o cérebro, onde atinge uma região chamada de hipocampo. O hipocampo é relacionado ao comportamento, à memória e à emoção. É por isso que os

³²SIANI, A.C. et al. Óleos Essências. **Biotecnología, Ciência & Desenvolvimento**, v. 76, p. 38-43, 2000.

³³SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed., Porto Alegre/Florianópolis, Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 467-497, 2003.

aromas são muitos indicados no tratamento de doenças psicossomáticas, ou seja, doenças oriundas de distúrbios psicológicos³².

Cerca de 3.000 óleos voláteis são conhecidos, dos quais aproximadamente 300 são comercialmente importantes, destinados principalmente para “flavours” e mercado de fragrâncias. Já há muito tempo se reconhece as propriedades antimicrobianas de alguns óleos voláteis sendo estes bem revisados no passado^{34,35}, bem como as propriedades antimicrobianas de plantas usadas como tempero³⁴. Mas o recente aumento do consumismo “verde” tem levado a uma renovação do interesse científico nestas substâncias³⁶. Além de propriedades antimicrobianas^{37,38,39}, os óleos voláteis, ou os seus componentes, destacaram-se por exibirem propriedades antivirais⁴⁰, antimicóticas^{41,42}, antiparasíticas^{43,44}, e inseticida⁴⁵. Estas são características relacionadas possivelmente a função destes componentes nas plantas⁴⁶.

Vários procedimentos são utilizados para a obtenção de óleos voláteis. Os métodos mais importantes, em nível laboratorial, são a destilação por arraste de vapor, a hidrodestilação, a extração por fluido supercrítico e a extração assistida por microondas⁴⁷.

³⁴COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564-582, 1999.

³⁵SHELEF, L.A. Antimicrobial effects of spices. **Journal of Food Safety**, n.6, p. 29-44, 1983.

³⁶BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

³⁷DEANS, S.G., RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 5, p. 165-180, 1987.

³⁸CARSON, C.F., COOKSON, B.D., RILEY, T.V. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 35, p. 421-424, 1995.

³⁹MOUREY, A., CANILLAC, N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. **Food Control**, v. 13, p. 289-292, 2002.

⁴⁰BISHOP, C.D. Antiviral activity of the essential of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) against tobacco mosaic virus. **Journal of the Essential Oil Research**, v. 7, p. 641-644, 1995.

⁴¹AZZOUZ, M.A., BULLERMANN, L. B. Comparative antimycotic effects of the selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. **Journal of Food Protection**, v. 45, n. 14, p. 1298-1301, 1982.

⁴²JAYASHREE, T., SUBRAMANYAM, C. Antiaflatoxic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. **Letters in Applied Microbiology**, v.28, p. 179-183, 1999.

⁴³PANDEY, R., et al. Essential oil compounds as potent source of nematicidal compounds. **Journal of Phytopathology**, v. 148, n. 7-8, p. 501-502, 2000.

⁴⁴PESSOA, L.M., et al. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 109, n. 1-2, p. 59-63, 2002.

⁴⁵KARPOUHTSIS, L., et al. Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1111-1115, 1998.

⁴⁶MAHMOUND, S.S., CROTEAU, R.B. Strategies for transgenic manipulation of terpene biosynthesis in plants. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 8, p. 366-373, 2002.

⁴⁷MARRIOT PJ, SHELIE R, CORNWELL C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. **Journal of Chromatography A**, v. 936, p. 1-22, 2001.

Já em escala industrial, até o momento a destilação por arraste de vapor e a extração supercrítica dominam os processos de obtenção de óleos voláteis⁴⁸.

A composição de óleos voláteis de cada espécie particular de planta pode diferir entre as épocas de colheita e entre fontes geográficas^{49,50,51,52,53,54,55}. Isto pode ser explicado, ao menos em parte, pela formação de substâncias antimicrobianas a partir de seus precursores. Como exemplo, o *p*-cimeno e o γ -terpineno são os precursores do carvacrol e do timol em espécies de *Origanum* e *Thymus*^{49,54}. A soma das quantidades destes quatro componentes presentes em oréganos de origem grega foram semelhantemente obtidas em espécimes oriundas de diferentes regiões geográficas⁵⁶, os quais permanecem estáveis em plantas colhidas durante as diversas estações do ano⁵⁴. O mesmo ocorre no *Thymus vulgaris* da Itália⁵⁷. Isto indica que os quatro componentes são biologicamente e funcionalmente associados e apóiam a teoria que o timol é formado a partir do *p*-cymeno e γ -terpineno em *T. vulgaris*⁵⁶. Geralmente, os óleos voláteis produzidos de plantas coletadas durante ou imediatamente após o período de florescência possuem a atividade antimicrobiana mais forte⁵⁷. A composição de óleos voláteis de partes diferentes da mesma planta também pode diferir expressivamente. Por exemplo, o óleo volátil obtido das sementes de coentro (*Coriandrum sativum* L.) tem uma composição bastante diferenciada do óleo de coentro obtido das folhas da mesma planta⁵⁵.

⁴⁸SERAFINI, S.A., BARROS, N.M., AZEVEDO, J.L. **Biotechnologia na agricultura e na agroindústria**. Ed. Agropecuária, Guaíba, RS, 390p., 2001.

⁴⁹COSENTINO, S., et al. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 130-135, 1999.

⁵⁰MARIOTT, M., PICCAGLIA, R., GIOVANELLI, E. Effects of planting time and mineral fertilization on peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil composition and its biological activity. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 9, p. 125-129, 1994.

⁵¹WILKINS, C., MADSEN, J.O. Oregano headspace constituents. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 192, p. 214-219, 1991.⁵¹

⁵²DAFERERA, D.J., ZIOGAS, B.N., POLISSIOU, M.G. The effectiveness of plant essential oils in the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, p. 39-44, 2003.

⁵³JULIANO, C., MATTANA, A., USAI, M. Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, p. 516-522, 2000.

⁵⁴JERKOVIC, I., MASTELIC, J., MILOS, M. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *Hirtum* grown wild in Croatia. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 36, p. 649-654, 2001.

⁵⁵DELAQUIS, P.J., et al. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 101-109, 2002.

⁵⁶KOKKINI, S., et al. Autumn essential oils of Greek oregano. **Phytochemistry**, v. 44, n.5, p. 883-886, 1997.

⁵⁷PASTER, N., et al. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 1, p. 81-85, 1995.

2.2.1 Aplicações dos Óleos Voláteis

Os óleos voláteis encontram aplicabilidade principalmente nos alimentos (como flavourizantes), perfumes (fragrâncias e pós-barba) e produtos farmacêuticos (pelas suas propriedades biológicas)^{34,58}. O famoso uso de óleos voláteis em aromaterapia constitui pouco mais que 2% do mercado total⁵⁹. Componentes individuais de óleos voláteis também são usados como flavorizantes em alimentos, tanto extraídos de plantas, como sinteticamente fabricados⁶⁰. As propriedades antimicrobianas dos óleos voláteis e de seus componentes são exploradas em diversos produtos comerciais para tratamentos odontológicos⁶¹, anti-sépticos⁶², bem como alguns conservantes contendo óleos voláteis, também já estão comercialmente disponíveis. “DMC Base Natural” é um preservativo de alimentos produzido na Espanha pela DOMCA S.A., e inclui 50% de óleos voláteis de alecrim, sálvia e cítricos e 50% de glicerol⁶³. Além disso, os efeitos fisiológicos dos óleos voláteis são amplamente usados em diferentes produtos comerciais como o inibidor de brotamento em batatas fabricado na Holanda (Talent[®])⁶⁴ e uma série de repelentes de insetos⁶⁵.

⁵⁸BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

⁵⁹INOUYE, S. Laboratory evaluation of gaseous essential oils. **International Journal of Aromatherapy**, v.13, n.2-3, p.96-107, 2003.

⁶⁰OOSTERHAVEN, K., POOLMAN, B., SMID, E.J. S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. **Industrial Crops and Products**, v. 4, p.23-31, 1995.

⁶¹MANABE, A., NAKAYAMA, S., SAKAMOTO, K. Effects of essential oils on erythrocytes and hepatocytes from rats and liposomes. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 44, p. 77-84, 1987.

⁶²COX, S.D., et al. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 170-175, 2000.

⁶³MENDOZA-YEPES, M.J., et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) en Spanish soft cheese. **Journal of Food Safety**, v. 17, p. 47-55, 1997.

⁶⁴HARTMANS, K.J., et al. The use of carvone in agriculture; sprout suppression of potatoes and antifungal activity against potato tuber and other plant diseases. **Industrial Crops and Products**, v. 4, p. 3-13, 1995.

⁶⁵CARSON, C.F., RILEY, T.V. Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 16, p. 49-55, 1993.

2.3 Biossíntese de Monoterpenos em Plantas

Os monoterpenóides, ou isoprenóides, são a maior e mais diversa família de produtos naturais, tendo variadas estruturas moleculares de lineares a policíclicas, desde hemiterpenos de cinco carbonos a borracha natural, constituída de milhares de unidades de isopreno. Todos os terpenóides são sintetizados através de condensações de unidades de isopreno (dimetilalil difosfato e isopentenil difosfato) e são classificadas pelo número de unidades isoprênicas (cinco carbonos) presentes na estrutura. Monoterpenos são da classe C₁₀ de isoprenóides, alcançando quase 1000 metabólitos voláteis, incolores e lipofílicos. Embora encontradas inteiramente na natureza, estas substâncias são os constituintes mais conhecidos de óleos voláteis, aromas florais e resinas protetoras de plantas aromáticas, as quais lhes conferem aromas e sabores característicos⁶⁶.

O papel fisiológico preciso da maioria dos monoterpenos de plantas ainda não foi bem definido, mas em geral, entende-se que eles atuam como mediador de interações entre planta e ambiente, atuando na atração de polinizadores, defesa e comunicação entre as plantas. Por exemplo, coníferas excretam uma complexa mistura de monoterpenos, sesquiterpenos (C₁₅) e diterpenos (C₂₀), denominada de oleoresina, em resposta ao ataque de insetos predadores. Esta secreção defensiva pode conter mais de 30 monoterpenos, incluindo limoneno, pineno e mirceno, que são tóxicos tanto para os insetos como para seus fungos simbióticos. Outros monoterpenos, como linalol, canfeno e cineol, são envolvidos na atração de polinizadores e na alelopatia⁶⁷.

Os monoterpenos também têm extensa aplicação industrial como agentes flavorizantes, em medicamentos tópicos, perfumes e inseticidas. Existem também evidências de que os monoterpenos têm uso potencial como herbicidas, pesticidas, agentes antimicrobianos e como agentes anticarcinogênicos em alimentos. Por causa de sua toxicidade relativamente baixa aos vertebrados, os monoterpenos oferecem vantagens significativas para a aplicação no controle de pragas, comparado com os métodos convencionais. Além disso, muitos monoterpenos são rapidamente catabolisados por microorganismos e não persistem no ambiente⁶⁶.

⁶⁶MAHMOUD, S.S.; CROTEAU, R.B. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. **Trends in Plant Science**, v. 8, p. 1360-1385, 2002.

⁶⁷PHILLIPS, M.A.; CROTEAU, R. Resin-based defenses in conifers. **Trends in Plant Science**, v. 4, n.5, p.184-190, 1999.

Nos óleos voláteis e oleoresinas produzidas pelas plantas, a produção de monoterpenos e sua acumulação é restrita a estruturas celulares altamente especializadas. Por exemplo, a biossíntese de monoterpenos em mentas ocorre nas células excretoras dos tricomas, os quais cobrem a superfície das partes aéreas das plantas, e o óleo volátil é estocado em cavidades subcuticulares desses tricomas. Similarmente, a biossíntese dos constituintes das oleoresinas em coníferas é localizada em vários tipos de dutos e bolsas de resinas, compostas de células epiteliais, com uma cavidade central de armazenamento. Plantas que não tem estas estruturas especializadas, tipicamente acumulam somente traços de monoterpenos⁶⁸.

Pesquisas ao longo de décadas vêm demonstrando conhecimento substancial sobre o metabolismo de monoterpenos em plantas. As rotas biossintéticas para muitos monoterpenos comercialmente importantes já foram estabelecidas e os genes que codificam as enzimas chave para a biossíntese tem sido clonados para diversas espécies. A disponibilidade de ferramentas moleculares e a importância econômica dos monoterpenos têm impulsionado um grande interesse na engenharia dessas rotas biossintéticas nas plantas⁶⁶.

2.3.1 Biossíntese dos Monoterpenos

Todos os monoterpenos são sintetizados através da condensação do isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero alílico dimetilalil difosfato (DMAPP). Os chamados terpenos “regulares” são produzidos pela adição seqüencial tipo “cabeça-cauda” do DMAPP e do IPP e compõe a grande maioria dos compostos desta categoria, entretanto os terpenos “irregulares”, mais incomuns, são produzidos pela associação não “cabeça-cauda” de duas unidades construtoras ou pelo rearranjo de uma estrutura regular (Figura 1)⁶⁹.

⁶⁸TURNER, G.W. et al. Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. **Plant Physiology**, v. 124, p. 655-664, 2000.

⁶⁹DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. England: John Willey & Sons, cap. 5, p. 153-172, 2000.

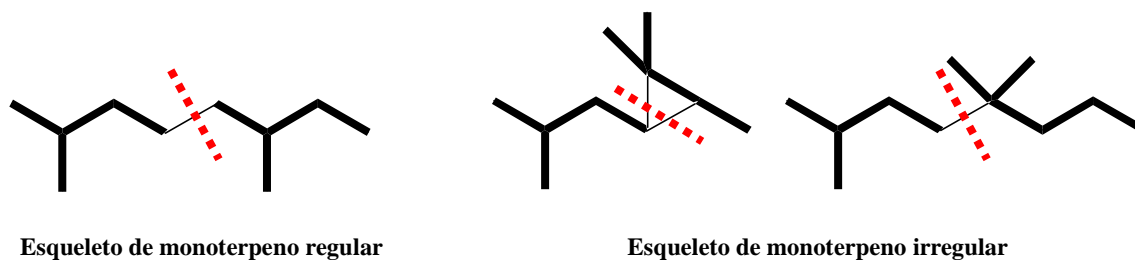
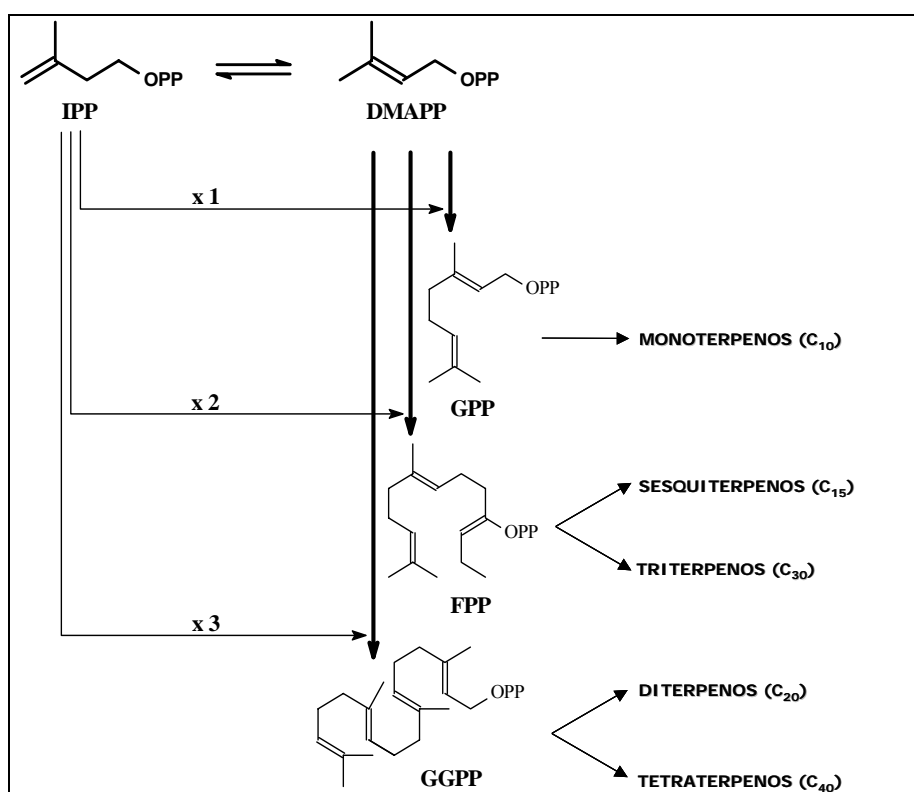


Figura 1. Exemplo de estruturas de monoterpene regulares e irregulares.

A adição seqüencial cabeça-cauda de unidades de IPP ao DMAPP inicialmente produz o geranyl difosfato (GPP, C₁₀), farnesil difosfato (FPP, C₁₅) e geranylgeranyl difosfato (GGPP, C₂₀), que so os precursores lineares da maior classe de terpenóides (Esquema 1)⁷⁰.



Esquema 1. Biossíntese de isoprenóides e o papel das prenil-transferases em plantas superiores. DMAPP: dimetilalil difosfato; FPP: farnesil difosfato; GGPP: geranylgeranyl difosfato; GPP: geranyl difosfato; IPP: isopentenil difosfato.

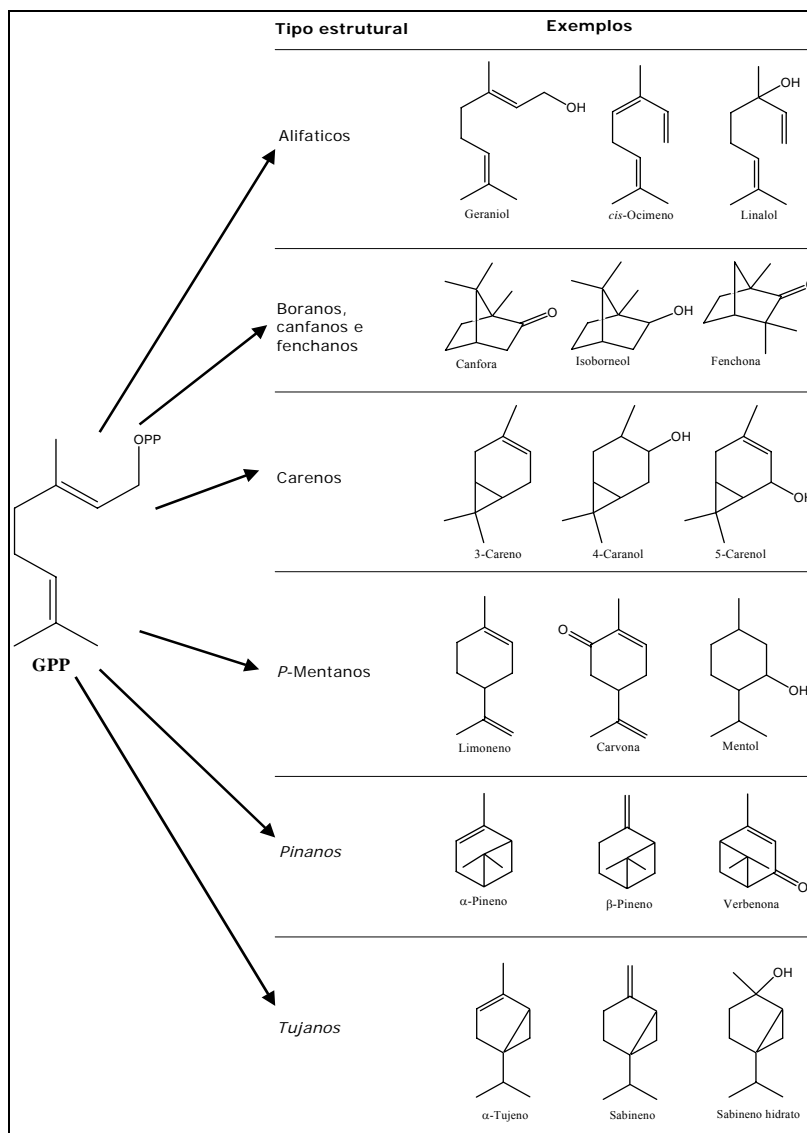
⁷⁰BICK, J.A.; LANGE, B.M. Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 415, p. 146-154, 2003.

Monoterpenos regulares são derivados exclusivamente do GPP, o qual é freqüentemente ciclizado para produzir o esqueleto principal de várias subfamílias de monoterpenos, relativamente poucos monoterpenos, como geraniol, linalol e ocimeno, são acíclicos. Os monoterpenos do tipo *p*-mentano, característicos de espécies de menta, são cicloexanóides, entretanto todos os outros grupos, incluindo os monoterpenos bornano, canfano, fenchano, careno e tujano apresentam esqueletos carbônicos bíciclicos (Esquema 2). Várias revisões sobre biossíntese de subfamílias de monoterpenos encontram-se disponíveis^{71,72,73}.

⁷¹DUBEY, V.S.; BHALLA, R.; LUTHRA, R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Journal of Bioscience**, v.28, n.5, 637-646, 2003.

⁷²EISENREICH, W; ROHDICH, F.; BACHER, A. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 2, p. 78-84, 2001.

⁷³WANKE, M.; TUDEK-S. K.; SWIEZEWSKA, E. Isoprenoid biosynthesis *via* 1-deoxi-D-xylulose 5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (DOXP/MEP) pathway. **Acta Biochimica Polonica**, v.48, n.3, p.663-671, 2001.



Esquema 2. Membros representativos de varias subfamílias de monoterpênos⁶⁶.

Os monoterpênos irregulares são obtidos pela união diferenciada de duas unidades de isopreno e rearranjos estruturais. Assim, embora DMAPP e IPP sejam utilizados na biossíntese, o geranyl PP e o farnesil PP não parecem ser envolvidos. Como exemplo, temos o ácido crisantêmico, precursor da piretrina, que é um componente inseticida obtido das flores de crisântemo (*Crysanthemum cinerariaefolium*). Sua estrutura ciclopropanóide é derivada de duas unidades isoprênicas unidas para a obtenção do ácido crisantêmico, como é demonstrado na Figura 2. O mecanismo diferenciado envolve duas unidades de DMAPP, com a formação do anel ciclopropano⁶⁹.

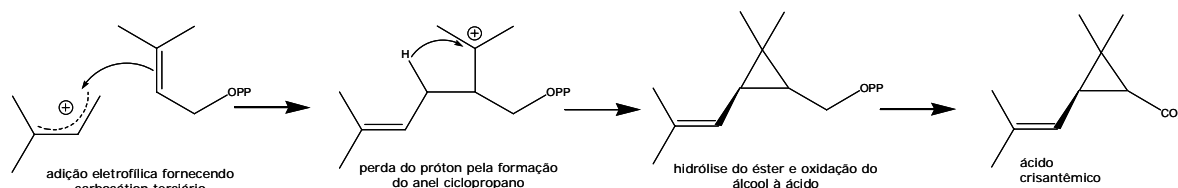
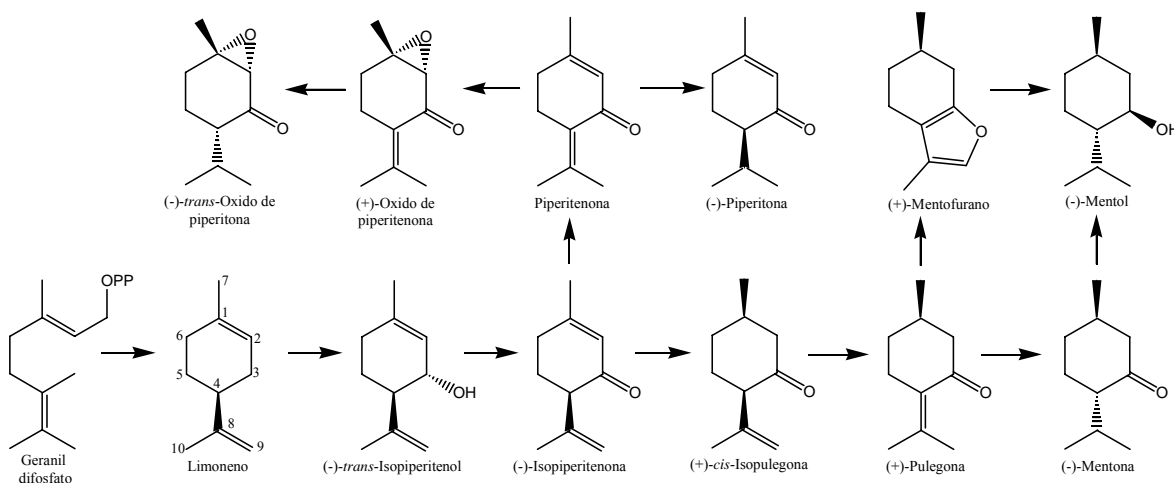


Figura 2. Biossíntese do ácido crisantêmico⁶⁹.

A maioria dos monoterpenos é produzida pela modificação de um composto inicial derivado do GPP. Por exemplo, a ciclização do GPP pela principal enzima terpeno sintase da *Mentha x piperita* origina o limoneno, que subsequente por transformações redox produz uma variedade de metabólitos estruturalmente relacionados (Esquema 3). Então, a biossíntese de monoterpenos pode ser descrita em quatro fases: **(i)** produção da unidade construtora de terpenóides (IPP e DMAPP); **(ii)** condensação do IPP e DMAPP por fenil transferases para formar o GPP; **(iii)** conversão do GPP ao esqueleto básico do monoterpeno; e **(iv)** transformação da estrutura básica nos seus derivados. O catabolismo dos monoterpenos e as perdas evaporativas parecem não influenciar no rendimento da produção destes produtos naturais nas plantas⁷⁴.



Esquema 3. Rota biossintética de monoterpenos no metabolismo da hortelã-pimenta.

⁷⁴ GERSHENZON, J. et al. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint (*Mentha x piperita* L.). **Plant Physiology**, v.122, p.205-213, 2000.

Produção do IPP e DMAPP

Até pouco tempo atrás, a rota clássica do mevalonato (MVA) para biossíntese de isoprenóides era considerada como uma rota universal para a produção do IPP. Além do mais, aceitava-se amplamente que o DMAPP era derivado do IPP via isomerização catalisada pela enzima IPP isomerase. Entretanto, agora se estabeleceu que as células de plantas produzem IPP através de dois caminhos independentes e quimicamente distintos (Figura 3). No citosol, o IPP (e, por isomerização o DMAPP) é gerado pela Acetil-CoA através do caminho do mevalonato (MVA), o qual fornece os precursores para a biossíntese dos sesquiterpenos (C₁₅) e triterpenos (C₃₀). Nos plastídios, a recentemente descoberta rota do 1-deoxi-D-xilose-5-fosfato (DPX)^{75,76} que opera em certos microorganismos, produz o IPP para a biossíntese de monoterpênicos (C₁₀), diterpenos (C₂₀) e tetraterpenos (C₄₀). O DMAPP surge independentemente do IPP neste caminho biossintético^{71,72}.

A rota biossintética do DXP inicia por uma condensação do tipo transcetolase de dois carbonos do piruvato com gliceraldeído-3-fosfato dando origem ao DXP e é seguido pela isomerização e redução do DXP a 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato, formação do derivado citidil-difosfato, fosforilacção do C2 e ciclização do 2-C-metil-eritritol-2,4-ciclodifosfato, o qual finalmente leva ao 4-hidroxi-DMAPP e depois ao IPP e DMAPP. Os genes que codificam as enzimas desta rota vem sendo isolados de plantas e bactérias⁷⁷.

Formação do GPP

A biossíntese do precursor de terpenóides GPP, FPP e GGPP a partir do IPP e DMAPP é catalisado por preniltransferases GPP sintase, FPP sintase e GGPP sintase, respectivamente. Todas as três enzimas podem usar IPP e DMAPP para os passos de alongação. Em adição, FPP e GGPP sintases podem ampliar GPP e FPP para formar os respectivos produtos (C₁₅) e (C₂₀)⁷⁰.

⁷⁵ ROHMER, M. et al. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenil diphosphate. **Biochemistry Journal**, v.295, p. 517-524, 1999.

⁷⁶ EISENREICH, W. et al. The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. **Chemical Biology**, v.5, R221-R233, 1999

⁷⁷ 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.

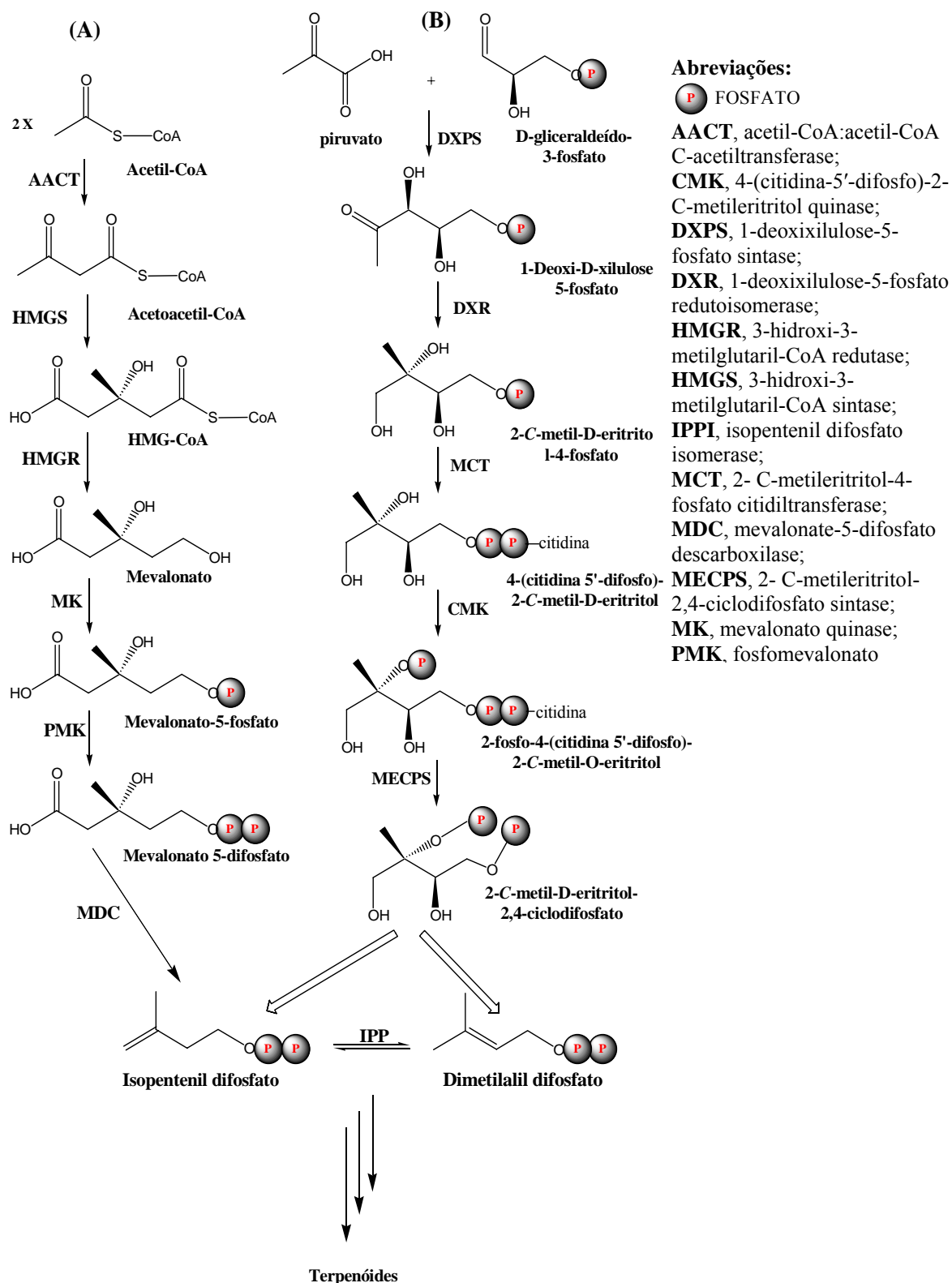


Figura 3. A rota biossintética do mevalonato. (a) rota independente do mevalonato (deoxixilulose fosfato) (b) para a biossíntese do isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP). O fosfato livre é destacado em vermelho e as flechas mais largas indicam passos que ainda não foram identificados⁷².

2.4 O Monoterpeno Carvona

Carvona (Figura 4) é um óleo incolor ou amarelo, insolúvel em água e miscível em etanol. Trata-se de um monoterpreno de grande interesse comercial, sendo obtido industrialmente de fontes naturais, principalmente das sementes do cominho (*Carum carvi* L.) e do endro (*Anethum graveolens* L.)⁷⁸. Este terpeno se tornou de extrema importância neste trabalho já que é o componente majoritário do óleo volátil da espécie *P. latifolia* estudada.

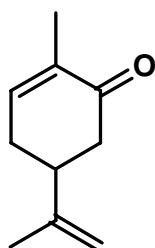


Figura 4. Fórmula estrutural do monoterpreno carvona.

A aplicação técnica mais importante da carvona é o uso como inibidor do brotamento de batatas durante armazenamento e da abertura de bulbos florais⁷⁹, também exibiu atividade de fungicida protegendo os tubérculos de batatas do deterioramento, sem alterar gosto e qualidade do produto tratado, e sem exibir toxicidade a mamíferos. Já foi introduzida para tais fins com o nome comercial de “Talent” na Europa^{80, 81}. Muitos outros usos potenciais podem ser citados como: inibidor do crescimento de bactérias^{82,83}, de alguns fungos⁸⁴, como um repelente de insetos⁸⁵, com agente nematocida⁸⁶, antitumoral e como

⁷⁸STARMANS, D.A.J.; BAYSAL, T. Supercritical carbon dioxide extraction of carvone and limonene from caraway seed. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, p.225-234, 1999.

⁷⁹OOSTERHAVEN, K, POOLMAN, B, SMID, E. J. S-Carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. **Industrial Crops and Products**, 1995, 4:23-31.

⁸⁰TRIPATHI, P.; DUBEY, N.K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest Biology Technology**, n. 32, p. 235-245, 2004.

⁸¹BAILER J, et al. Essential oil content and composition in commercially available dill cultivars in comparison to caraway. **Industrial Crops and Products**, v. 14, p.229-239, 2001.

⁸²HELANDER L. M., et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-positive bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, 1998.

⁸³NAIGRE, R., et al. Comparison of antimicrobial properties of monoterpenes and their carbonylated products. **Planta Medica**, v.62, n. 3, p. 275-277, 1998.

⁸⁴SMID E. J., DE WITTE, Y., GORRIS, L. G. M. Secondary plant metabolites as control agents of postharvest *Penicillium* rot on tulip bulbs. **Postharvest Biology and Technology**, v. 6, p. 303-312, 1995.

⁸⁵SALOM SM, et al. Evaluation of natural products as antifeedants for the pales weevil and as fungitoxins for *Leptographium procerum*. **Journal of Entomological Science**, v. 31, n.4, p. 453-465, 1996.

⁸⁶ESTER, A., ROZEN VAN, K. Effect of Nemaslug[®], salt or carvona on the slug damage in green asparagus. **Asparagus Research Newsletter**, v.19, n.5, p.10-21,2003.

regulador do crescimento de algumas plantas⁸⁷ Ainda a carvona, em suas duas formas enantioméricas, é amplamente usada como bloco construtor quiral na síntese de produtos naturais⁸⁸.

A composição enantiomérica da carvona obtida de fontes naturais é bem diversificada, ela está presente como o enantiômero *S*-(+) no cominho e no endro, entretanto, nem sempre puro.⁸⁹ Outras espécies de plantas podem conter *R*-(-)-carvona, como a *Mentha spicata* ou carvona na forma racêmica^{81,90}.

A composição enantiomérica da carvona obtida de fontes naturais é bem revisada e rotas biossintéticas propostas são utilizadas em estudos visando o desenvolvimento de processos fermentativos de produção industrial de carvona, em larga escala.^{91,92} Gershenzon, Maffei e Croteau (1989)⁹³ proporam a rota metabólica e a enzimologia para a obtenção da *R*-(-)-carvona a partir da *Mentha spicata* (Esquema 4), o caminho biossintético qual requer quatro passos metabólicos, envolvendo reações muito frequentes na biossíntese de terpenóides.

⁸⁷VERSTEGEN-HAAKSMA, A. A., et al. Application of *S*- carvone in the synthesis of biologically active natural products using chemical transformations and bioconversions. **Industrial Crops and Products**, v. 4, p. 15-21, 1995.

⁸⁸GONZÁLEZ, M. A., et al. Synthesis of (+)- and (-)-isocarvone. **Tetrahedron Letters**, n. 45, p. 5039-5039-5041, 2004.

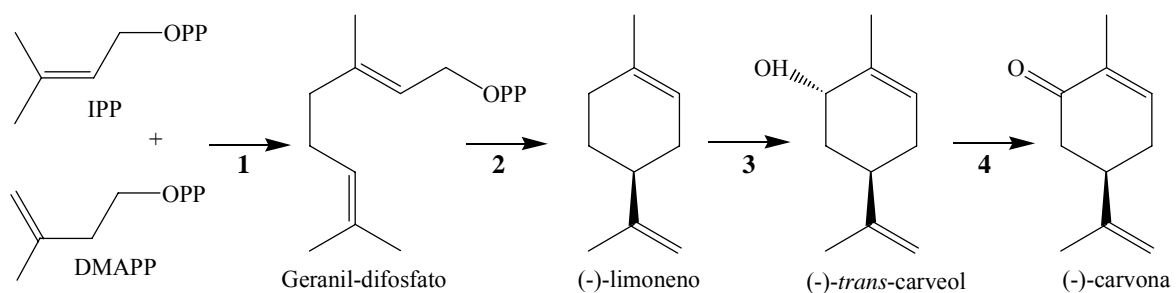
⁸⁹FABER, B., BANGERT, K., MOSAMDL, A. GC-IRMS and enantioselective analysis in chemical studies in dill (*Anethum graveolens* L.). **Flavours Frangance Journal**, v. 12, n. 5, p. 305-314, 1997.

⁹⁰RANI K, AKHILA A. Biosynthesis of (+)- and (-)-carvone and limonene and their biogenetic relationship with other oxygenated monoterpenes in *Mentha cardiaca*. **Fitoterapia**; v. 69, n. 4, p. 337-348, 1998.

⁹¹CARTER, O., PETERS, R. J., CROTEAU, R. Monoterpene biosynthesis pathway construction in *Escherichia coli*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 425-433, 2003.

⁹²HAUDENSCHILD, C., SCHALK, M., CROTEAU, R. Functional Expression of regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from Mint (*Mentha ssp.*) in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 379, n. 1, p. 127-136, 2000.

⁹³GERSHENZON, J., MAFFEI, M., CROTEAU, R. Biochemical and hystochemical localization of terpene biosynthesis in the glandular trichomes of spearmint (*Mentha spicata*). **Plant Physiology**, v. 89, p.1351-1357, 1989.



Esquema 4. Rota para a biossíntese de (-)-carvona a partir de precursores primários isopentenil-difosfato (IPP) e dimetil-alil-difosfato (DMAPP).

As enzimas indicadas são: **1.** geranyl difosfato sintase, **2.** limoneno sintase, **3.** citocromo P-450 limoneno-6-hidroxilase; **4.** carveol desidrogenase.

2.5 Técnicas Analíticas para Óleos Voláteis

A análise, separação e identificação de misturas complexas de multicomponentes, como são os óleos voláteis, pode ser realizada por técnicas de Cromatografia Gasosa (CG), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e espectroscópicas, dentre as quais as mais frequentes são a Espectrometria na região do Ultravioleta (UV), do Infravermelho (IV), de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN H) e de Carbono (RMN ^{13}C) e a Espectrometria de Massas (EM), além do uso de bibliotecas contendo informações de um grande número de substâncias já conhecidas⁹⁴.

Numerosas publicações tratam das diferentes composições químicas de inúmeros óleos voláteis extraídos de plantas^{51,52,53,54,55}. Em grande parte, os óleos voláteis podem incluir mais de sessenta componentes individuais, sendo que os componentes principais podem constituir até 85% do óleo volátil, considerando que outros componentes estejam presentes como traços³⁶.

As técnicas analíticas permitem a avaliação da qualidade de óleos voláteis, garantindo, assim, a constância de constituintes químicos e a segurança na utilização. A avaliação quantitativa e qualitativa envolve a utilização de diversas técnicas básicas, que passaram por algumas alterações nos últimos anos, devido essencialmente à revolução da informática (programa de computadores, níveis de automação, forma de integração dos dados obtidos) e da sofisticação dos experimentos que podem ser realizados, resultando na dedução de estruturas coerentes³³.

No contexto de pesquisa de óleos voláteis, a cromatografia gasosa tem sido a ferramenta mais amplamente utilizada para a separação, identificação e quantificação dos constituintes.

2.5.1 Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa é um dos métodos mais atrativos para a análise de substâncias puras ou para a análise de uma mistura de substâncias. Trata-se de um método sensível, que tem a vantagem de não ser afetado pela presença de impureza na amostra, além de ser um método de fácil manuseio⁹⁵.

⁹⁴ CHAAR, J.S. Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo volátil da espécie *Aniba duckei* Kostermans. **Tese de Doutorado**, USP/IQ-São Carlos, São Paulo, 118p., 2000.

⁹⁵ HOSTETTMANN, K., QUEIROZ, E. F., VIEIRA, P.C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. Série de textos da Escola de Verão em Química, v. IV, EdUFSCar, São Carlos, 2003.

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.

Óleos voláteis são, geralmente, constituídos por uma série de componentes, principalmente de terpenóides voláteis, os quais se apresentam naturalmente como hidrocarbonetos, álcoois, cetonas, aldeídos, fenóis, ésteres, etc. Devido à importância desta classe de metabólitos, pesquisadores desta área, procuram por tecnologias mais efetivas no que diz respeito à separação e identificação destes voláteis⁹⁶.

2.5.2 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

Existem no mercado várias empresas que oferecem o conjunto cromatográfico gasoso-espectrometria de massas (CG-EM), acoplado através de uma interface que aumenta a concentração da amostra no gás de arraste. A velocidade de varredura é grande o suficiente para permitir a obtenção de diversos espectros de massas por pico eluído no cromatógrafo⁹⁷. E também a conexão direta de colunas capilares de cromatografia gasosa ao espectrômetro de massas permite várias varreduras de massas rápidas em pontos diferentes de um pico cromatográfico, de modo a testar sua homogeneidade. Desse modo, é possível resolver picos cromatográficos parcialmente superpostos. Assim, a espectrometria de massas acoplada à cromatografia gasosa fornece as fragmentações dos componentes individuais separados^{48,98}.

Na técnica de impacto de elétrons (IE), 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

⁹⁶BICCHI, C., D'AMARO, A., RUBIOLLO, 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.

⁹⁷BLOOR, S., PORTER, L. J. Mass Spectrometry. In: **Bioactive natural products: detection, isolation and structural determination**. [edited by] Colegate, S. M. & Molyneux, R. J., CRC Press, Flórida, EUA, p.105-120, 1993.

⁹⁸ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Illinois, 451p., 1995.

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 um certo número de fragmentos iônicos que podem ser posteriormente decompostos em fragmentos menores⁹⁹. 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 percentagem.

2.5.3 Cromatografia Gasosa Enantiosseletiva

Ao contrário de muitos outros metabólitos obtidos de plantas, os componentes quirais de óleos essenciais são encontrados na natureza nas duas formas enantioméricas (-/+) sendo, muitas vezes, apenas um dos enantiômeros o responsável pelo aroma, sabor ou atividade biológica do componente⁹⁶.

A separação quiral através de CG pode ser indireta ou direta. O meio indireto envolve a derivatização de um composto quiral com auxiliar quiral. Os diastereoisômeros formados por esta associação podem ser separados por uma fase estacionária aquiral. Pelo meio direto, utiliza-se uma fase estacionária quiral, como seletor, que forma um intermediário diastereoisomérico transitório com o composto.

Inicialmente eram utilizadas colunas empacotadas, com baixa resolução principalmente quando se tratava de uma mistura complexa de componentes. Porém com o advento das colunas capilares de sílica fundida, mesmo misturas complexas de voláteis puderam ser resolvidas. A partir dos anos 80, com a descoberta de fases quirais derivadas de ciclodextrinas, foi possível realizar a identificação e a separação de enantiômeros voláteis de mono- e sesquiterpenos. A CG enantiosseletiva (CGE) tornou-se uma ferramenta indispensável na análise da autenticidade desses óleos, principalmente no contexto industrial, na detecção de adulterantes, caracterização do perfil do óleo para controle de qualidade e também associada à investigação dos mecanismos biossintéticos dos terpenóides⁴⁷.

⁹⁹SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5 ed., Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan S.A., , 387p., 1994.

III. PROSPECÇÃO DE COMPOSTOS BIOLOGICAMENTE ATIVOS

O uso de plantas medicinais vem crescendo gradativamente ao longo dos últimos anos, devido a vários fatores, como o baixo poder aquisitivo da maior parte da população, que procura uma medicina alternativa a menores custos e medicamentos destituídos de efeitos colaterais, e produtos que também propiciem maior atividade contra microorganismos, em especial, aquelas espécies resistentes aos antibióticos de uso corrente¹⁰⁰.

No entanto, estes fatos, estão relacionados, principalmente, aos estudos científicos, particularmente, aos estudos químicos e farmacológicos que comprovam a eficácia das propriedades medicinais existentes em uma grande variedade de espécies vegetais.

Muitos pesquisadores vêm estudando a possibilidade de encontrar atividades biológicas, entre elas, antibacteriana, antifúngica e citotóxica em plantas superiores e também nas inferiores, com o objetivo de obter novos compostos ou substâncias que possam ser eficientes na terapêutica medicamentosa. Por esta razão, investe-se na pesquisa de produtos naturais, para a obtenção de princípios ativos isolados, a partir de extratos ou de frações, obtidas das plantas, para uma possível aplicação prática no tratamento de infecções causadas por microorganismos como fungos, bactérias, parasitas, vírus e micobactérias¹⁰¹.

Os óleos voláteis derivados de plantas são muito utilizados como agentes flavorizantes na indústria alimentícia e devido a seu conteúdo versátil de compostos antimicrobianos, eles possuem um grande potencial como agentes naturais para preservação de alimentos.

A atividade antimicrobiana de óleos voláteis é atribuída a um número de pequenos terpenóides e compostos fenólicos, os quais quando isolados, também tem demonstrado atividade antibacteriana e antifúngica. Os mecanismos específicos de ação dos constituintes antimicrobianos dos óleos voláteis, como timol e carvacrol permanecem, entretanto, pobremente caracterizados. As propriedades antibacterianas desses compostos

¹⁰⁰BEEK, T.A., MAARTEN, A.P., LELYVELD, G.P. *Phytochemistry*, v. 26, n. 11, p. 3005-3010, 1987.

¹⁰¹COLEGATE, S.M., MOLYNEUX, R. J. **Bioactive Natural Products**: detection, isolation and structural determination. CRC Press, EUA, 507p., 1993.

são evidentemente associadas com seu caráter lipofílico, levando a acumulação nas membranas e subseqüentes eventos de rompimento celular, associados a essa membrana⁸².

Neste trabalho realizaram-se triagens de algumas atividades biológicas, como atividade antimicrobiana, citotóxica e antioxidante, consideradas importantes para óleos voláteis. Estes ensaios foram realizados utilizando metodologias rápidas, simples e efetivas, já bem estabelecidas no Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais através do Laboratório de Microbiologia.

3.1 Óleos Voláteis e suas propriedades antimicrobianas

Apesar do desenvolvimento de técnicas avançadas de produção de alimentos, a segurança alimentar é um assunto de saúde pública de alta importância. Estima-se que, a cada ano, mais de 30% da população de países industrializados sofra de doenças causadas por alimentos, sendo que no ano de 2000 cerca de dois milhões de pessoas morreram de doença diarréicas no mundo todo¹⁰². Há ainda uma necessidade de buscar novos métodos para reduzir ou eliminar patógenos de alimentos, possivelmente em combinação com métodos já existentes⁵⁸. Ao mesmo tempo, a sociedade moderna vem experimentando uma tendência de consumismo “verde”¹⁰³, desejando menos aditivos alimentares sintéticos e produtos com um menor impacto ambiental. Além disso, a Organização Mundial de Saúde recomendou recentemente uma redução mundial no consumo de sal de forma a reduzir a incidência de doenças cardiovasculares¹⁰⁴. Se o nível de sal em alimentos processados for reduzido, é possível que outros aditivos venham a ser necessário para manter a segurança dos alimentos. Há então, espaço para novos métodos de preservação dos alimentos que tenham uma imagem natural ou “verde”. Uma destas possibilidades é o uso de óleos voláteis como aditivo antimicrobiano de alimentos.

Já há muito tempo se reconhece as propriedades antimicrobianas de alguns óleos voláteis sendo estes bem revisados no passado^{105,106}, bem como as propriedades

¹⁰²WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Food safety and foodborne illness**. World Health Organization Fact, sheet 237, revised January 2002. Geneva.

¹⁰³SMID, E.J., GORRIS, L.G.M. Natural antimicrobials for food preservation. In: Rahman M.S., **Handbook of Food Preservation**. Marcel Dekker, New York, p. 285-308, 1999.

¹⁰⁴WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World health report 2002**. Reducing risks, promoting healthy life. Geneva, 30 October 2002, p. 248, 2002.

¹⁰⁵COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564-582, 1999.

¹⁰⁶SHELEF, L.A. Antimicrobial effects of spices. **Journal of Food Safety**, n.6, p. 29-44, 1983.

antimicrobianas de plantas usadas como tempero¹⁰⁵. Mas o recente aumento do consumismo “verde” tem levado a uma renovação do interesse científico nestas substâncias⁵⁸.

Dentre os constituintes mais encontrados em óleos voláteis, os componentes fenólicos são os principais responsáveis pelas propriedades antimicrobianas dos óleos voláteis⁴⁹. Os componentes majoritários de vários óleos voláteis com propriedades antimicrobianas são apresentados na Tabela 1 e a fórmula estrutural de alguns desses compostos antimicrobianos estão na Figura 5.

Tabela 1. Principais constituintes de alguns óleos voláteis com propriedades antimicrobianas.

Nome comum	Nome científico ^a	Constituintes majoritários	Composição média	Referência
Coentro	<i>Coriandrum sativum</i>	Linalol	70%	Delaquis et al., 2002
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol	traços- 80%	Kokkini et al., 1997; Daferera et al., 2000.
		Timol	traços- 64%	
		γ -terpineno	2 - 52%	
		<i>p</i> -cimeno	traços-52%	
Alecrim	<i>Rosmarium officinalis</i> L.	α -pineno	2 - 25%	Daferera et al., 2000, 2003.
		acetato de bornila	0 - 17%	
		Cânfora	2 - 14%	
		1,8-cineol	6 - 14%	
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i>	Timol	10 - 64%	Cosentino et al., 1999; Marino et al., 1999; Daferera et al., 2000; Juliano et al., 2000.
		Carvacrol	2 - 11%	
		γ -terpineno	2 - 31%	
		<i>p</i> -cimeno	10 - 56%	

^a Óleos voláteis que mostraram propriedades antimicrobianas em testes “in vitro” sendo que suas composições podem ser encontradas nas referências citadas.

Existem evidências claras de que os componentes secundários de óleos tenham uma atuação crítica na atividade antimicrobiana, possivelmente produzindo um efeito sinérgico entre os demais componentes, isto tem sido considerado no caso de algumas espécies de sálvia¹⁰⁷, certas espécies de *Timus*^{108,109} e também de orégano⁴⁹.

¹⁰⁷MARINO, M., BERSANI, C., COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of the essential oils from *Lamiacea* and *Compositae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 187-195, 2001.

¹⁰⁸PASTER, N., et al. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 1, p. 81-85, 1995.

¹⁰⁹MARINO, M., BERSANI, C., COMI, G. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 9, p. 1017-1023, 1999.

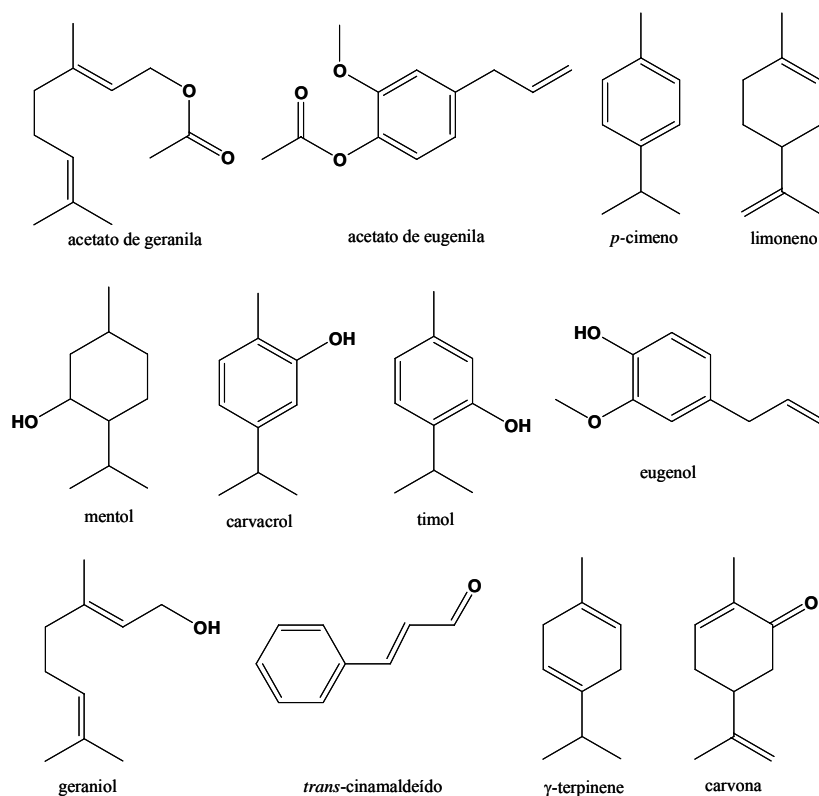


Figura 5. Fórmula estrutural dos constituintes antimicrobianos de alguns óleos voláteis.

3.2 Modo de ação antimicrobiana

Embora as propriedades antimicrobianas de óleos essenciais e os seus componentes tenham sido revisadas no passado^{35,37,106}, o mecanismo de ação ainda não foi bem determinado¹¹⁰. Considerando o grande número de diferentes compostos químicos apresentados nos óleos voláteis, é provável que a atividade antimicrobiana deles não esteja ligado a um mecanismo específico, mas que existam vários alvos na célula^{111,112}. Os locais ou mecanismos na célula microbiana que são vistos como local de ação para os componentes de óleos voláteis estão indicados na Figura 6. Todos estes mecanismos não são alvos separados; alguns são afetados como consequência de outro alvo.

¹¹⁰LAMBERT, R.J.W., SKANDAMIS, P.N., COOTE, P., NYCHAS, G.-J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal Applied Microbiology**, n. 91, p. 453-462.

¹¹¹SKANDAMIS, P.N., NYCHAS, G.J-E. Effect of orégano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. **Journal of Applied Microbiology**, n. 91, p. 1011-1022.

¹¹²CARSON, C.F., MEE, B.J., RILEY, T.V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p.1914-1920, 2002.

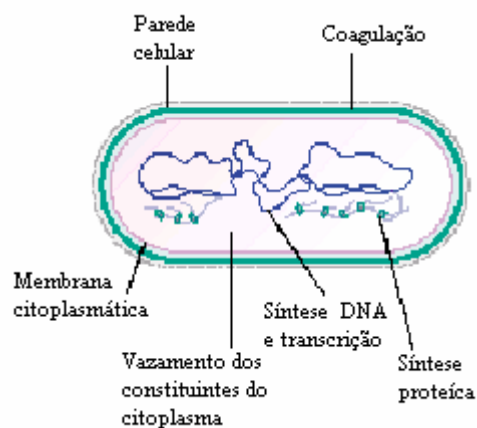


Figura 6. Localização e mecanismos na célula microbiana que podem ser sítios de ação dos componentes de óleos voláteis.

Uma característica importante de óleos voláteis e de seus componentes é sua hidrofobicidade que os habilitam a particionar-se nos lipídios da membrana celular microbiana e nas mitocôndrias, perturbando as estruturas e tornando-os mais permeáveis^{113,114}, podendo ocasionar vazamentos de íons e outros conteúdos celulares^{62,110,111,112}, e possivelmente conduzir a morte¹¹⁵.

Os óleos voláteis e seus componentes são conhecidos por serem ativos contra uma ampla variedade de microrganismos, incluindo bactérias gram-negativas. Todas as bactérias gram-negativas possuem uma membrana externa que protege a célula com uma superfície hidrofílica, devido à presença de lipopolissacarídeos. Apenas substâncias hidrofílicas pequenas conseguem permear esta membrana externa, entretanto tal membrana serve como barreira para macromoléculas e compostos hidrofóbicos e, por esta razão que bactérias Gram-negativas são relativamente resistentes a antibióticos hidrofóbicos e outras drogas⁸².

Geralmente, os óleos voláteis que possuem propriedades antimicrobianas mais efetivas contra patógenos alimentares, contêm uma porcentagem alta de componentes fenólicos, como carvacrol, eugenol e timol^{49,53,110,115}. Sendo o mecanismo de ação semelhante para outros compostos fenólicos; geralmente considera-se este como uma

¹¹³ SIKKEMA, J., DE BONT, J.A.M., POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 11, 8022-8028, 1994.

¹¹⁴ SIKKEMA, J., DE BONT, J.A.M., POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, v. 59, n. 2, p.201-222, 1995.

¹¹⁵ DORMAN, H.J.D., DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plants volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, n. 88, p. 308-316, 2000.

perturbação da membrana citoplasmática, levando ao seu rompimento, a um transporte ativo e ou a coagulação de conteúdos de célula^{114,116}.

As estruturas químicas dos componentes individuais dos óleos voláteis regem o seu modo preciso de ação e sua atividade antimicrobiana¹¹⁵. A importância da presença de grupos hidroxila em compostos fenólicos como carvacrol e timol, já é bem reconhecida^{117,115}. Entretanto, a posição relativa da hidroxila no anel fenólico não parece influenciar fortemente o grau de atividade antimicrobiana, já que a ação de timol contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* parece ser comparável a do carvacrol, por exemplo^{110,117}. Porém, em outro estudo, o carvacrol e o timol foram citados por agirem diferentemente contra espécies de bactérias gram-positivas e gram-negativas¹¹⁵. A significância do próprio anel fenólico foi também demonstrada pela falta de atividade de mentol comparado ao carvacrol¹¹⁷ (Figura 5). Em mais outro estudo, a adição de um acetato livre a uma molécula demonstrou o aumento da atividade antibacteriana, pois o acetato de geranila foi mais ativo contra uma gama de espécies gram-positivas e negativas do que o respectivo geraniol¹¹⁵ (Figura 5).

¹¹⁶DAVIDSON, P. M., PARISH, M. E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. **Food Technology**, n. 43, p. 148-155, 1989.

¹¹⁷ULTEE, A., BENNINK, M. H. J., MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus* on rice. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1561-1568, 2002.

3.3 Testes “*in vitro*” de atividade antimicrobiana

Testes de atividade antimicrobiana podem ser classificados como difusão, diluição ou métodos de bioautografia¹¹⁸. Os métodos do NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), para testar a suscetibilidade antimicrobiana, que são principalmente apontados como prova para antibióticos, já foram modificados para testar óleos voláteis^{119,120}.

Pesquisadores tentam adaptar diversos métodos experimentais de forma a representar possíveis aplicações focadas particularmente em suas áreas de atuação. Porém, como o resultado de um teste pode ser afetado por vários fatores como: o método extração do óleo volátil da planta, o volume do inóculo, a fase de crescimento do microorganismo, meio de cultura usado, pH do meio de cultura e ainda o tempo e temperatura de incubação¹¹⁸, uma comparação de dados publicados torna-se complicada^{121,122}.

Várias revisões já relataram os métodos usados para estudos de atividade antimicrobiana realizados com óleos voláteis^{35,118,121}. Em documentos publicados desde então, o número de variações do tipo de meio de cultura, tamanho do inóculo, escolha do emulsificante e mesmo o método básico de teste vêm aumentando gradativamente.

Entre os principais métodos, a concentração inibitória mínima (CIM) é citada pela maioria dos investigadores como uma medida do desempenho antimicrobiano de óleos voláteis. A definição do CIM difere entre publicações e isto é outro obstáculo para comparação entre os estudos. Em alguns casos, a concentração bactericida/fungicida mínima, (CBM/CFM) ou a concentração bacteriostática/fungioestática também são citadas, sendo que estes termos podem levar a situações que concordam de perto com o CIM. Uma lista das condições freqüentemente usadas em testes de atividade antimicrobiana de óleos voláteis é apresentado em Tabela 2. Em adição, o termo “concentração letal mínima” também vem sendo usado mas não está definido¹¹⁹.

¹¹⁸RIOS, J.L., RECIO, M.C., VILLAR, A. “*screening*” methods for natural antimicrobial products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, p. 127-149, 1988.

¹¹⁹HAMMER, 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.

¹²⁰NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, 5th edition, **NCCLS document M7-A5**, 2000.

¹²¹JANSSEN, A.M.; SCHEFFER, J.J.C.; BAERHEIM, S. A. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. **Planta Medica**, v.53, p. 396-398, 1987.

¹²²FRIEDMAN, M., HENIKA, P.R.; MANDRELL, R.E. Bactericidal activities of plants essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 10, p. 1545-1560, 2002.

Tabela 2. Termos usados em testes de atividade antimicrobiana.

Termo	Definição, com referência à concentração do óleo volátil	Referência
Concentração Inibitória Mínima (CIM)	A menor concentração que reduz a viabilidade do inoculo.	Carson et al., 1995.
	A menor concentração requerida para completa inibição do microrganismo teste após 48 h de incubação	WA net al., 1998; Canillac and Mourey, 2001.
	Menor concentração que inibe o crescimento visível do microrganismo testado	Hammer et al., 1999; Delaquis et al., 2002
	A menor concentração que resulta em redução significativa da viabilidade do inoculo (>90%)	Cosentino et al., 1999.
Concentração Bactericida/Fungicida Mínima (CBM/CFM)	Concentração onde 99,9% do inóculo inicial foi morto.	Carson et al., 1995, Cosentino et al., 1999.
	A menor concentração na qual não há crescimento microbiano após uma nova cultura em caldo.	Onawunmi, 1989.
Concentração Bacteriostática/Fungiostática	A menor concentração na qual o microorganismo não cresce em caldo, mas quando pe cultivado sobre ágar, volta a se desenvolver.	Smith-Palmer et al., 1998.
Concentração Bactericida/Fungicida	A menor concentração na qual o microorganismo não cresce em caldo, mas quando é cultivado sobre ágar, volta a se desenvolver.	Smith-Palmer et al., 1998.

O “*screening*” de óleos voláteis para atividade antimicrobiana é frequentemente realizado pelo método de difusão de disco ou pelo método de bioautografia. Isto é geralmente usado como uma checagem preliminar para atividade antimicrobiana antes de estudos mais detalhados. Fatores como o volume de óleo volátil colocado nos discos de papel, a densidade da camada de ágar e o uso de alguns solventes, variam consideravelmente entre estudos. Mesmo sendo este método útil para seleção entre óleos voláteis, comparações de dados publicados não são possíveis^{115,118}.

A quantificação da atividade antimicrobiana pode ser determinada por diluição de óleo volátil em ágar ou caldo. Os estudos publicados com diluição em ágar usaram solventes diferentes para incorporar o óleo volátil no meio¹²³, e diferentes volumes de inóculo (1–100 µL)^{123,124}. Apesar destas variações, o CIMs de óleos voláteis determinados através de diluição em ágar geralmente permanecem dentro da mesma ordem de magnitude^{123,125}.

¹²³PRUDENT, D., et al. Analysis of the essential oil of wild oregano from Martinique - evaluation of its bacteriostatic and fungiostatic properties. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, p. 165-173, 1995.

¹²⁴JUVEN, B.J, KANNER, J., SCHUED, F. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Bacteriology**, v.76, p. 626-631, 1999.

¹²⁵PINTORE, G., et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. **Flavour and Fragrance Journal**, v.17, p. 15-19, 2002.

Em estudos de diluição em caldo, várias técnicas existem para determinar o ponto final, na maioria dos métodos usados, são realizadas medidas de densidade óptica (turvação) e a enumeração de colônias através de contagem de viáveis. O método anterior tem a vantagem de poder ser automatizado, enquanto o posterior é bastante trabalhoso. A determinação do ponto final através de monitoramento visual está sendo cada vez menos usada¹²⁶. Novos métodos de microdiluição para determinar o CIM de óleos usam indicadores de oxi-redução (tais de tetrazólio, resazurina, etc.) como um indicador visual do ponto final. Os resultados foram comparados favoravelmente com aqueles obtidos por contagem de viáveis e o método é mais sensível que o método de diluição de ágar¹²⁶, sendo que o método pode ser automatizado medindo o ponto final através de fluorescência em vez de meios visuais¹²⁷.

Uma característica das metodologias dos testes que variam consideravelmente é o uso ou não de um emulsificante ou solvente para dissolver o óleo volátil ou estabilizá-lo em meio de cultura à base de água. Várias substâncias são usadas para este propósito: etanol^{107,124,128}, metanol¹²⁹, Tween-20^{119,126}, Tween-80^{65,49,124,130}, polietileno glicol¹²⁵, propileno glicol¹³¹, dimetil sulfoxido^{132,133} e ágar^{55,119,126}. Porém, vários pesquisadores acharam desnecessário usar algum elemento aditivo^{110,115,133}.

3.4 Determinação de Atividade Antimicrobiana

A utilização estratégica de bioensaios como bioautografia e CIM para rastreamento de compostos antimicrobianos em misturas complexas (*e.g.*, extratos orgânicos brutos de produtos naturais e óleos voláteis) constituem uma abordagem amplamente

¹²⁶MANN, C. M., MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 538-544, 1998.

¹²⁷LANCASTER, M. V., FIELDS, R. D. **Antibiotic and cytotoxic drug susceptibility assays using resazurin and poisoning agents**. US Patent and Trademark Office Patent, nr. 5, 501: 959, USA, 1996.

¹²⁸PACKIYASOTHY, E. V., KYLE, S. Antimicrobial properties of some herb essential oils. **Food Australia**, v. 54, n. 9, p. 384-387, 2002.

¹²⁹ONAWUNMI, G. O. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. **Letters in Applied Microbiology**, v. 9, p. 105-108, 1989.

¹³⁰WILKINSON, J. M., et al. Bioactivity of *Backhousia citriodora*: Antibacterial and antifungal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 76-81, 2003.

¹³¹NEGI, P. S., et al. Antibacterial activity of tumeric oil: a byproduct from curcumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4297-4300, 1999.

¹³²FIROUZI, R., AZADBAKHT, M., NABINEDJAD, A. Anti-listerial activity of essential oils some plants. **Journal of Applied Animal Research**, v. 14, p. 75-80, 1998.

¹³³BURT, S., REINDERS, R. D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 162-167.

consagrada^{115,118,134}, ainda que bastante preliminar no sentido de não fornecer informações sobre o mecanismo de ação dos compostos testados. Entretanto, dado o custo relativamente baixo se comparado a ensaios mais específicos como, por exemplo, a inibição de enzimas isoladas, a bioautografia e a CIM, quando utilizadas em conjunto, são insuperáveis no contexto de triagem. Sendo então as mesmas utilizadas para a triagem das amostras selecionadas neste trabalho.

3.4.1 Determinação da Atividade Antimicrobiana pelo Método de Bioautografia.

A bioautografia é um método qualitativo aplicado à detecção de compostos antimicrobianos em misturas de composição variada e mesmo desconhecida. A amostra a ser testada é aplicada em silicagel, alumina, papel ou qualquer outro suporte adequado à cromatografia em camada delgada (CCD). A separação dos componentes da amostra aplicada com uma fase móvel de escolha pode ser realizada se o interesse for a verificação dos princípios ativos dentro de uma mistura complexa. O suporte contendo a amostra é então depositado em uma placa de petri e uma fina camada de meio de cultura é aplicada sobre a placa, proporcionando o cultivo de um microrganismo sobre os componentes da amostra (Figura 7).

A presença de um composto antimicrobiano é visualizada pela formação de zonas de inibição no crescimento do microrganismo cultivado. O princípio do teste é o da difusão em ágar, entretanto, na bioautografia, os compostos inibidores do crescimento microbiano podem ser identificados por medidas de R_f . Isto torna a bioautografia uma ferramenta de valor no sentido do monitoramento do processo de isolamento de produtos naturais bioativos⁹⁵.

¹³⁴SAXENA, G., FARMER, S., TOWERS, G.H.N. Use of specific dyes in the detection of antimicrobial compounds from crude plant extracts using a thin layer chromatography agar overlay technique. **Phytochemical Analysis**, v. 6, p. 125-129, 1995.

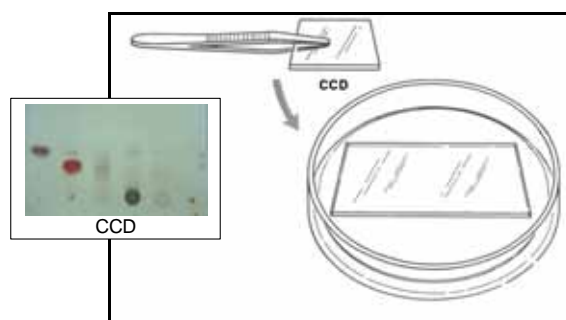
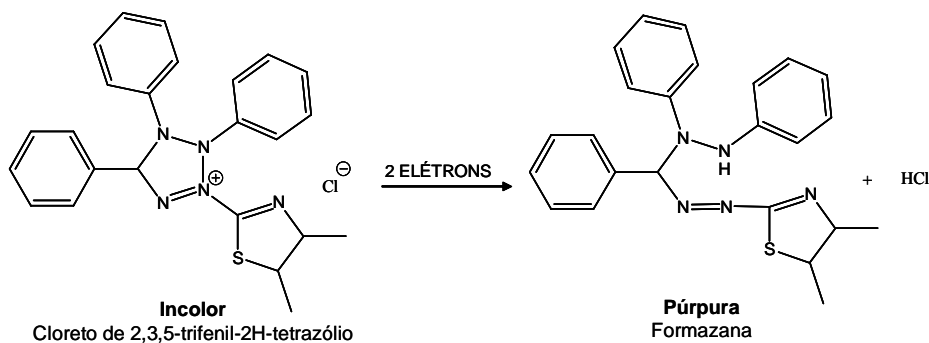


Figura 7. Colocação de CCD em placa de Petri para realização de bioautografia

Possivelmente, a única desvantagem em relação a outros testes é o fato de que as zonas de inibição do crescimento microbiano são formadas sobre um fundo opaco, a placa cromatográfica, o que na prática dificulta a leitura do resultado, principalmente quando bactérias são utilizadas no ensaio. Não obstante, o inconveniente é facilmente superado por meio de revelação química das placas com corantes indicadores de microrganismos vivos. Sais de tetrazólio como TTC (cloreto de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazólio) e MTT (brometo de 4,5-dimetil-2H-tetrazólio) são amplamente utilizados para este fim, pois formam espécies altamente coloridas, conhecidas como formazanas, ao serem reduzidos por componentes da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria do microorganismo (Esquema 5)¹³⁵.



Esquema 5. Representação da reação de redução do TTC, com a formação da formazana.

Os ensaios de determinação de atividade antimicrobiana pelo método de Bioautografia foram realizados de acordo com Hamburguer e Hostettmann^{136,137}.

¹³⁵ALTMAN, F.P. **Tetrazolium salts and formazans**. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, 56 p. 1976.

¹³⁶HAMBURGUER, M, HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991.

¹³⁷HAMBURGUER, A. L., FUCHS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography**, v. 51, p. 327-329, 1970.

3.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo Método de Microdiluição.

A efetividade antimicrobiana de uma substância é frequentemente descrita em termos de sua Concentração Inibitória Mínima (CIM), que é um ensaio quantitativo aplicado à avaliação da potência da atividade antimicrobiana de misturas, principalmente óleos voláteis, ou substâncias puras. Este método pode ser realizado em macro- (1-5 mL) ou microdiluição (100-500 μL) e avalia o comportamento dos microrganismos frente a concentrações crescentes dos compostos antimicrobianos em meio de cultura líquido (Figura 8). A menor concentração capaz de inibir a multiplicação dos microrganismos é denominada de CIM^{58,65,115,119,126}.

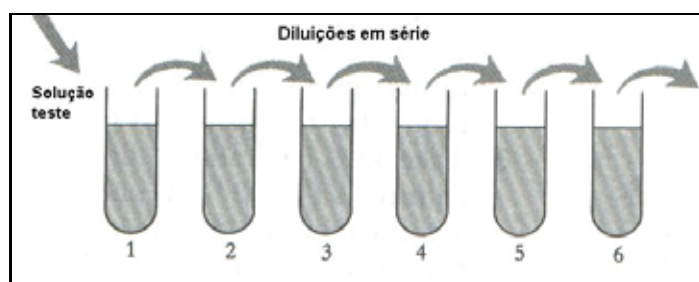


Figura 8. Diluições em série para determinação de CIM.

O método mais utilizado atualmente é o de microdiluição, no qual o CIM é determinado em placas de cultura de 96 poços, onde uma série de diluições da amostra é realizada em meio líquido, podendo conter um elemento surfactante. Os poços são então inoculados com suspensão microbiana e as placas são incubadas. O crescimento microbiano (turvação) e o CIM são observados visualmente, sendo que as culturas que não apresentam crescimento são usadas para inocular placas com meio sólido, de forma a determinar a Concentração Bactericida ou Fungicida Mínima (CBM/CFM). Segundo Hammer, et al. (1999)¹¹⁹ trata-se da menor concentração da substância que alcança uma redução maior que 99,9% do número de unidades formadoras de colônias (UFC).

3.5 Determinação de Toxicidade “In Vivo”.

3.5.1 Teste de letalidade por *Artemia salina*



Artemia salina é um pequeno crustáceo que se desenvolve em habitat marinhos, com alta salinidade (25%). São extremamente abundantes em seu habitat natural, sendo bastante suscetíveis, durante o desenvolvimento, a poluição e toxinas no ambiente marinho tornando-se útil como indicador biológico.

O ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* foi inicialmente proposto por Michael, et al. (1956)¹³⁸, desenvolvido por Van Haecke, et al. (1981)¹³⁹ e Meyer, et al. (1982)¹⁴⁰. Tem como base a habilidade de uma substância em matar larvas de *Artemia salina* criadas em laboratório.

Este método é considerado como uma ferramenta bastante eficiente, rápida, simples e barata de avaliação preliminar de atividade farmacológica¹⁰¹. Sendo muito usado na avaliação da toxicidade de substâncias puras¹⁴¹ e de extratos de plantas, na detecção de toxinas fúngicas, metais pesados e pesticidas¹⁴². Além de “screening” teratológicos e ecotoxicológicos¹⁴³. Uma boa correlação tem sido feita com teste de letalidade para *Artemia salina* na detecção de compostos antitumorais¹⁴⁰, anti-*Trypanosoma cruzi*¹⁴² e antimaláricos¹⁴⁴.

O teste é realizado pela eclosão dos ovos de *Artemia salina* em solução salina e após a eclosão, as larvas são submetidas a uma série de diluições da amostra por um período de 24 h. Determina-se a CL₅₀, a concentração letal capaz de matar 50% da

¹³⁸MICHAEL, A. S., THOMPSON, C. G., ABRAMOVITZ, M. *Artemia salina* as a test organism for bioassay. **Science**, v. 123, p. 464, 1956.

¹³⁹VAN HAECKE, P., PERSUUNE, G. Report on an intercalibration exercise on a short term standard toxicity test with *Artemia nauplii* (ARC test). **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 5, p. 352-387, 1981.

¹⁴⁰MEYER, B.N, et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

¹⁴¹CADWELL, G.S. MATTHEW, G.B., PETER, J. W. The use of a brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehydes. **Toxicon**, v. 12, p. 120-127, 2003.

¹⁴²CARBALLO, J. L. et al. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**, v. 2, p.17-22, 2002.

¹⁴³ALVES, T. M. A., et al. Biological “screening” of Brazilian medicinal plants. **Memorial. Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.

¹⁴⁴CHENG, S-S., et al. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 99-102, 2003.

população total de animais, pelo método de Probits¹⁴⁵ ou por métodos de regressão linear. As amostras são consideradas ativas quando $CL_{50} < 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.6 Teste de Atividade Antioxidante

As espécies reativas do oxigênio são reconhecidas como responsáveis por um grande número de doenças, assim como pelo processo de envelhecimento. Os radicais livres constituem um alvo interessante para o desenvolvimento de novas drogas. Além disso, os antioxidantes sintéticos mais utilizados em alimentos (butil hidroxitolueno, BHT; butil hidroxianisol, BHA; *ter*-butil hidroquinona, TBHQ; e galato de propila, PG) estão sendo apontados como promotores de efeitos maléficos à saúde humana.¹⁴⁶

Neste contexto, os antioxidantes de origem natural merecem atenção especial, pois as plantas sintetizam um grande número de metabólitos capazes de captar os radicais livres. Os mecanismos de ação desses compostos são diversos, incluindo-se a captura de oxigênio singlete, a desativação de radicais por reações de adição covalente, a redução de radicais peróxidos e a complexação de metais de transição¹⁴⁷.

Por esta razão há um interesse crescente em estudos de aditivos naturais como antioxidantes. Recentemente, muitas fontes de antioxidantes de origem vegetal vem sendo estudados, sendo que os estudos envolvendo plantas aromáticas demonstraram propriedades antioxidantes efetivas, pela inibição de processos de peroxidação de lipídios em óleos e alimentos gordurosos. Várias compostos não-voláteis como carnosol, quercetina, ácido cafeico e ácido rosmárico são bem conhecidos como bons trapeadores de radicais livres, porém alguns compostos voláteis de óleos essenciais também são potenciais agentes naturais de preservação de alimentos¹⁴⁶.

Existem vários métodos que são usados para estimar as propriedades antioxidantes de uma substância ou mistura complexa, dentre os quais, a determinação da habilidade de trapear radicais livres é bastante utilizada. Neste método, o ensaio empregando o radical estável 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) tem recebido grande destaque por ser de fácil

¹⁴⁵FINNEY, D. J. **Probit Analysis**: a statistical treatment of the sigmoid response curve. University Press, Cambridge, p. 55-80, 1974.

¹⁴⁶MILOS, M., et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of orégano essential oil. **Analytical, Nutritional and Clinical Methods**, v. 85, p. 633-640, 2004.

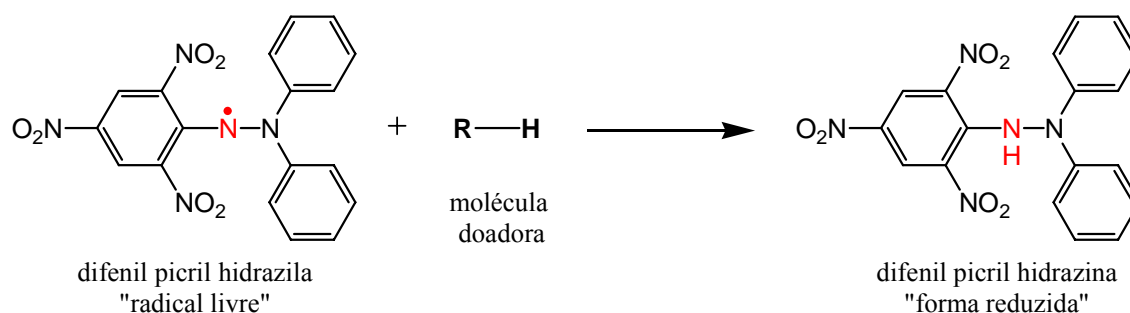
¹⁴⁷YEN, G-C., DUH, P-D. Scavenging Effects of Methanolic Extracts of Peanut Hulls on Free-Radical and Active-Oxygen Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 629-632, 1994.

realização e baixo custo, sendo o teste mais amplamente usado para obter informações da capacidade trapeadora de radicais livres de vários produtos naturais^{95,148}.

3.6.1 Método do radical livre DPPH

A molécula do DPPH é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização de um elétron disponível na parte central da molécula, assim, a molécula não se dimeriza, como ocorre com muitos outros radicais. Esta deslocalização também dá origem à uma coloração violeta intensa, caracterizada por uma banda de absorção, em solução alcoólica, centrada em 520 nm¹⁴⁹.

Quando uma solução de DPPH é misturada com uma substância que pode doar um átomo de hidrogênio, isto dá origem a sua forma reduzida com perda da coloração violeta, permanecendo apenas um resíduo de cor amarelo pálido de algum grupo de picril presente. A reação primária que ocorre é representada no Esquema 6, a seguir⁹⁵.



Esquema 6. Representação esquemática da reação do radical livre DPPH com a molécula doadora de H, dando origem a sua forma reduzida, DPPH-H.

Esta reação genérica pretende então promover uma ligação com as reações que acontecem em sistemas oxidativos, como na autoxidação de lipídeos ou outras substâncias insaturadas, a molécula de DPPH representa desta forma, os radicais livres formados no sistema cuja atividade será suprimida pela substância testada⁹⁵.

¹⁴⁸OREOPOULOU, V., TSIMOGIANNIS, D. I. Free radical scavenging and antioxidant activity of hydroxy-substituted flavonóides. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 5, p. 523-528, 2004.

¹⁴⁹MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarín Journal of Science Technology*, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2003.

A redução de radical DPPH permite então estimar a atividade antioxidante em termos da habilidade do composto ou mistura de compostos como doador de elétrons (H) ou trapeador de radicais livres. O teste biológico é relativamente simples: os extratos, frações, óleos voláteis ou produtos puros a testar são depositados em placa de cromatografia em camada delgada (sílica gel), sendo que a separação cromatográfica com um sistema solvente apropriado pode ser realizada. Após a secagem, a CCD é vaporizada com uma solução metanólica de DPPH. As atividades anti-radicalares aparecem na forma de manchas amareladas sobre fundo violeta. A determinação da atividade antioxidante em solução também é possível. O trabalho deve ser efetuado com a ajuda de microplacas com 96 orifícios e de um leitor de microplacas^{148,149}.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 GERAL:

4.1.1 Ressonância Magnética Nuclear

Os experimentos de RMN foram registrados em um Espectrômetro BRUCKER DPX-400, do Departamento de Química, da Universidade Federal de Santa Maria, operando a 400 MHz para H e 100 MHz para ^{13}C , em tubos de 5 mm, utilizando-se como solvente o clorofórmio deuterado (CDCl_3). Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em "ppm", em relação ao TMS ($\delta = 0,00$).

4.1.2 Espectrometria de Massas

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás marca HP modelo 6890, do Instituto de Química da Unicamp disponibilizado pela Prof^a Anita J. Marsaioli, equipado com injetor split-splitless, coluna capilar HP-5 (polimetilfenilsiloxisano), 30 m, 0,32 mm de diâmetro interno, acoplado a espectrômetro de massas marca HP 5973. Foi utilizado como gás de arraste hélio ultrapuro, sendo a temperatura do injetor de 250°C e a programação de análise com $T_{\text{inicial}} = 35^\circ\text{C}$, $T_{\text{final}} = 310^\circ\text{C}$, rampa de aquecimento de 3°C/min, e com uma pressão de gás de arraste de 7 Psi. Os dados obtidos foram comparados com os dados da biblioteca Willey de espectros de massas.

4.1.3 Cromatografia Gasosa

Os experimentos de CG foram realizados em cromatógrafos a gás Varian modelos: 3800 e CP 3800. A detecção dos sinais foi realizada através de um detector de ionização de chama (DIC), utilizando hidrogênio ultrapuro como gás de arraste (fase móvel), com uma pressão de gás de arraste 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.

4.1.4 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Foram utilizadas cromatofolhas de sílica-gel 60 F₂₅₄, com 0,25 mm de espessura, sobre alumínio (Merck, cód. 1.05554.001), como fase estacionária. As fases móveis correspondem às misturas de solventes, descritas na literatura, ou criadas no decorrer deste trabalho, para a adequação a problemas específicos. A revelação foi realizada com luz UV ($\lambda = 254$ nm) e, através da borrifação com solução etanólica de H₂SO₄ a 10%, seguida de tratamento térmico.

4.1.5 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

Foram utilizadas placas de vidro recobertas com uma fina camada de sílica-gel 60 GF₂₅₄ (Merck), com 2,0 mm de espessura, como fase estacionária. As fases móveis correspondem às misturas de solventes, criadas durante este trabalho, para a adequação a problemas específicos. A revelação foi realizada com luz UV ($\lambda = 254$ e 366 nm) e, através da borrifação com solução etanólica de H₂SO₄ a 10%, seguida de tratamento térmico.

4.1.6 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 óxido de cálcio.

Acetato de etila: seco sobre CaCl₂ e destilado.

Clorofórmio: seco sobre CaCl₂ e destilado.

Éter etílico: destilado.

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

4.2 Coleta de material vegetal e identificação de plantas

As espécies selecionadas foram coletadas em locais diversos e armazenadas no Herbário da Universidade Federal de Santa Maria, onde foram identificadas pela botânica Prof.^a Taís do Canto Dorow. As coletas foram efetuadas no período de novembro de 2002 a novembro de 2004, sendo realizadas em diversas épocas do ano, de modo a avaliar todas as fases de desenvolvimento da planta.

***Poiretia latifolia* Briq.:** Foi primeiramente coletada na divisa das cidades de Santa Maria e São Pedro, sendo o material testemunho armazenado no Herbário da UFSM com a exsicata de número: SMDB 9502 (amostra denominada *nativa*). Devido ao interesse pelo estudo desta espécie, alguns exemplares desta amostra foram transplantados para o Jardim Botânico da UFSM para facilitar o monitoramento da espécie (amostra denominada *cultivada*).

***Poiretia tetraphylla* Vog.:** Esta espécie foi coletada no Jardim Botânico da UFSM, único local onde foi encontrada, sendo o material testemunho armazenado no Herbário da UFSM com a exsicata de número: SMDB 9501 (amostra denominada *cultivada*).

4.3 Extração do óleo volátil de *P. latifolia* e *P. tetraphylla*.

Folhas e flores frescas de *Poiretia latifolia* Briq. foram coletadas, separadas e submetidas a hidrodestilação utilizando um aparelho de Clevenger modificado (Figura 15), obtendo-se um óleo de aspecto incolor a amarelo claro.

As folhas de *Poiretia tetraphylla* Vog. também foram coletadas e submetidas a hidrodestilação, obtendo-se um óleo de aspecto amarelo claro. As flores desta espécie não foram analisadas devido ao seu pequeno porte e também a pequena quantidade de planta encontrada no único ponto de coleta selecionado.

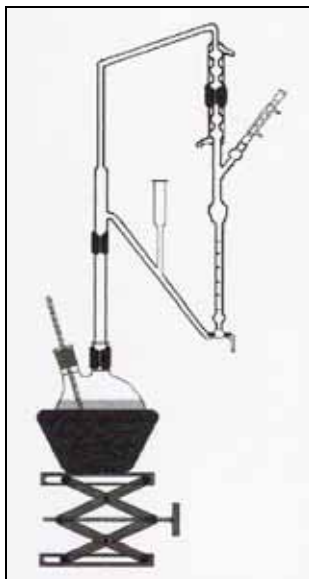


Figura 9. Aparelho de Clevenger modificado, utilizado na extração do óleo essencial.

4.4 Análise dos óleos voláteis das espécies de *Poiretia*

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 existente⁹⁸, identificando-se cada constituinte.

Também foram realizadas análises das amostras com co-injeções de padrões de algumas substâncias disponíveis no NPPN. Os experimentos de CG foram realizados utilizando-se colunas capilares de sílica fundida (CCSF) com dimensões: 25 m x 0,25 mm, contendo fases estacionária apolar SE-54 (Polimetilfenilsiloxano-5%fenil) e a fase polar PEG-20M (Polietilenoglicol), ambas utilizando o mesmo programa de injeção, indicados nos respectivos cromatogramas. Os percentuais dos constituintes dos óleos analisados foram obtidos pela área do pico, considerando todos os fatores de resposta do detector DIC igual a um.

4.5 Determinação do Índice de Retenção de Kovats para os Constituintes dos Óleos Voláteis.

Os índices de retenção de Kovats^{50,98} foram determinados através da injeção de uma mistura de *n*-alcanos (C₁₀ a C₂₀) 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 através de cálculos dos componentes do óleo e comparação destes, com os padrões de igual índice de retenção, encontrados na literatura⁹⁸.

4.6 Amostras para Cromatografia Gasosa

Amostras para CG foram preparadas utilizando-se alíquotas de 10 μ L do óleo volátil, dissolvido em 500 μ L de hexano para cromatografia e armazenados em frascos com tampa de silicone e mantidas sob refrigeração. Em cada análise foram injetados 0,2 μ L desta solução utilizando seringas Hamilton com capacidade de 10 μ L.

4.7 Isolamento do monoterpene carvona

Para separar o componente principal do óleo volátil de *P. latifolia*, empregou-se cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP).

Utilizaram-se placas preparativas de sílica gel previamente ativadas, onde foram aplicadas 100 mg do óleo volátil, empregando como eluente uma mistura de hexano e acetato (9:1).

4.8. Preparação e fracionamento do extrato etanólico das raízes de *P. latifolia* nativa

O material vegetal (370 g de raiz) foi seco, inicialmente sob luz, evitando assim a presença de fungos e, após em estufa de ar seco circulante, à temperatura de 50 °C, sendo em seguida moído em moinho Wiley. De posse do material moído, realizou-se uma extração a frio, sendo utilizado como solvente etanol técnico, após sucessivas extrações, evaporou-se o solvente em rotaevaporador sob pressão reduzida, obteve-se um resíduo escuro e viscoso, denominado extrato etanólico com rendimento de 37 g (10% do peso da planta).

Para o fracionamento, adicionou-se 500 mL de água destilada e homogeneizou-se, sendo esta solução extraída exaustivamente com solvente de polaridades crescentes como hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol. Cada fração obtida foi submetida à secagem com sulfato de sódio anidro, filtrada e analisada por CCD. As frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila foram usadas em estudos de atividade biológica.

4.9. 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	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538p
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS:	
<i>Salmonella setubal</i>	ATCC 19796
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25792
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
FUNGOS (LEVEDURAS):	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	ATCC 2601
<i>Candida dubliniensis</i>	Isolado clínico SM-26
<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC 28952

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

4.9.1 Meios de cultura empregados

Meio ágar nutritivo: 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 Mueller Hinton: meio utilizado para bactérias nos ensaios de bioautografia.

Fórmula (g L⁻¹)

Ágar	17,0
Amido de batata	1,5
Extrato de carne	2,0
Hidrolisado ácido de caseína	17,5

Meio ágar sabouraud dextrosado: meio utilizado para repiques de fungos e também nos ensaios de bioautografia.

Fórmula (g L⁻¹)

Ágar	15,0
Dextrose	40,0
Peptona de carne	5,0
Peptona de caseína	5,0

Meio caldo caseína de soja: meio utilizado em ensaios de concentração inibitória mínima no cultivo de bactérias.

Fórmula (g L⁻¹)

Cloreto de sódio	5,0
Dextrose	2,5
Fosfato dibásico de potássio	2,5
Peptona de caseína	17,0
Peptona de soja	3,0

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 recém destilada e esterilizados em autoclave a 121 °C, 1 atm., por 15-20 minutos.

4.9.2 Preparo das suspensões microbianas (inóculo)

A 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).

4.9.3 Determinação da Atividade Antimicrobiana pelo Método de Bioautografia.

Os ensaios de determinação de atividade antimicrobiana pelo método de Bioautografia foram realizados de acordo com Hamburguer e Hostettmann^{150,151}. As amostras em solução foram aplicadas sob cromatoplasmas em uma série de concentrações na faixa de 3,12 a 150 µg para os óleos voláteis e 25 a 300 µg para as frações do extrato etanólico. Para cada cromatoplasma, aplicou-se um padrão de antibiótico, cloranfenicol para bactérias e nistatina para fungos, em concentrações adequadas, de acordo com o microorganismo a ser testado.

Para a realização deste teste foram utilizadas placas de petri (10 x 100 mm), onde foram depositadas as cromatoplasmas contendo as amostras aplicadas. Em seguida foram adicionados, para cada placa, 10 mL do meio de cultura adequado já contendo a suspensão do microorganismo indicador. Após a solidificação dos meios, as placas foram incubadas na posição invertida a 35 °C por 16 a 24 horas para bactérias e a 27 °C por 48 horas para fungos. Decorrido o período de incubação, as placas são reveladas com uma solução aquosa de TTC (5 mg mL⁻¹).

4.9.4 Determinação da CIM pelo método de microdiluição

Empregou-se a técnica descrita pela NCCLS¹²⁰, com algumas modificações^{152,153}, 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,

¹⁵⁰ HAMBURGUER, M., HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3864-3887, 1991.

¹⁵¹ HAMBURGUER, A.L., FUCHS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography**, v. 51, p. 327-329, 1970.

¹⁵² HAMMER, K.A., CARSON, C.F., RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 985-990, 1999.

¹⁵³ BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food-a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p.223-253, 2004.

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 e CFM, 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 triplicatas.

4.10 Determinação de toxicidade “*in vivo*”.

4.10.1 Teste de letalidade por *Artemia salina*

Os ovos de camarão, *Artemia salina* e o sal marinho (Ocean Water – Alcon), foram adquiridos em uma loja de aquários local. O teste de letalidade empregado foi adaptado do método descrito por Colegate e Molyneaux¹⁰¹. Os ovos de artemia foram eclodidos, em um período de 48 a 72 horas, em um aquário utilizando-se água do mar artificial obtidas de acordo com as especificações do fabricante. O sistema foi sob forte aeração e temperatura controlada (25 a 28 °C).

As amostras foram previamente dissolvidas em DMSO ou álcool etílico, sendo misturadas à água do mar artificial contendo 2% de surfactante Tween 80, para auxiliar a solubilização das mesmas. De 10 a 15 camarões foram adicionados em placas contendo 96 poços, onde logo após, a solução das amostras foram aplicadas em concentrações finais de 100 a 1000 µg mL⁻¹.

Após um período de 24 h observou-se o número total de camarões vivos e mortos, determinando-se CL₅₀, por métodos de regressão linear. As análises foram realizadas em triplicata, obtendo-se uma média dos resultados.

4.11 Teste de Atividade Antioxidante

4.11.1 Método do radical livre DPPH

O ensaio empregado foi o do radical estável 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH), descrito por Hostettmann⁹⁵.

As amostras em solução foram aplicadas em cromatoplasmas na forma de spots, tanto em uma única concentração como também em séries de concentrações na faixa de 1 a 100 µg, como antioxidantes padrões foram utilizadas substâncias naturais (quercetrina e isoquercetrina), sendo aplicadas juntamente com as amostras.

Após a aplicação das placas preparou-se uma solução metanólica de DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila), a qual foi imediatamente borrifada sobre as cromatoplasmas, deixando-as em repouso por cerca de 1 hora. Aos poucos a coloração violácea do DPPH foi diminuindo, com a formação de manchas com coloração amarela sobre o fundo violeta.

V. ESTUDO DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DAS ESPÉCIES DE *Poiretia*

APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1. Coleta do material

As espécies selecionadas foram coletadas em locais diversos e armazenadas no Herbário da Universidade Federal de Santa Maria, onde foram identificadas pela botânica Prof.^a Taís do Canto Dorow. As coletas foram efetuadas no período de novembro de 2001 a novembro de 2004, em diversas épocas do ano, de forma a realizar uma análise sazonal da planta, avaliando todas as fases de seu desenvolvimento.

O material testemunho deste trabalho permanece armazenado no Herbário da UFSM com exsiccatas de número: SMDB 9502 para *Poiretia latifolia* Briq. e número: SMDB 9501 para *Poiretia tetraphylla* Vog.

5.2 Estudo do óleo volátil de folhas e flores de *Poiretia latifolia*.

As folhas e flores das amostras de *P. latifolia* coletada na divisa entre os municípios de Santa Maria e São Pedro do Sul (**nativa**) e das amostras coletadas no Jardim Botânico da UFSM (**cultivada**) foram submetidas a hidrodestilação em sistema Clevenger modificado. O rendimento médio para a extração do óleo volátil das folhas foi de 0,6% e para as flores de 0,15%, na amostra nativa, e 0,35% para as folhas e 0,12% para as flores, na amostra cultivada.

A análise destes óleos através de cromatografia gasosa indicou uma diferença significativa entre as amostras nativa e cultivada. Desta forma, os dados destas amostras foram tratados separadamente.

5.2.1 Determinação dos constituintes do óleo das folhas de *P. latifolia* nativa.

Os óleos voláteis das folhas de *P. latifolia* foram submetidos a análise cromatográfica, sendo possível a identificação da maioria dos constituintes químicos. As Figuras 10, 11 e 12 ilustram o perfil cromatográfico das amostras durante os períodos da

primavera (A), verão (B) e outono (C), enquanto as respectivas constituições químicas encontram-se na Tabela 3. A numeração dos constituintes apresentada nos cromatogramas corresponde à numeração dos mesmos na Tabela 3.

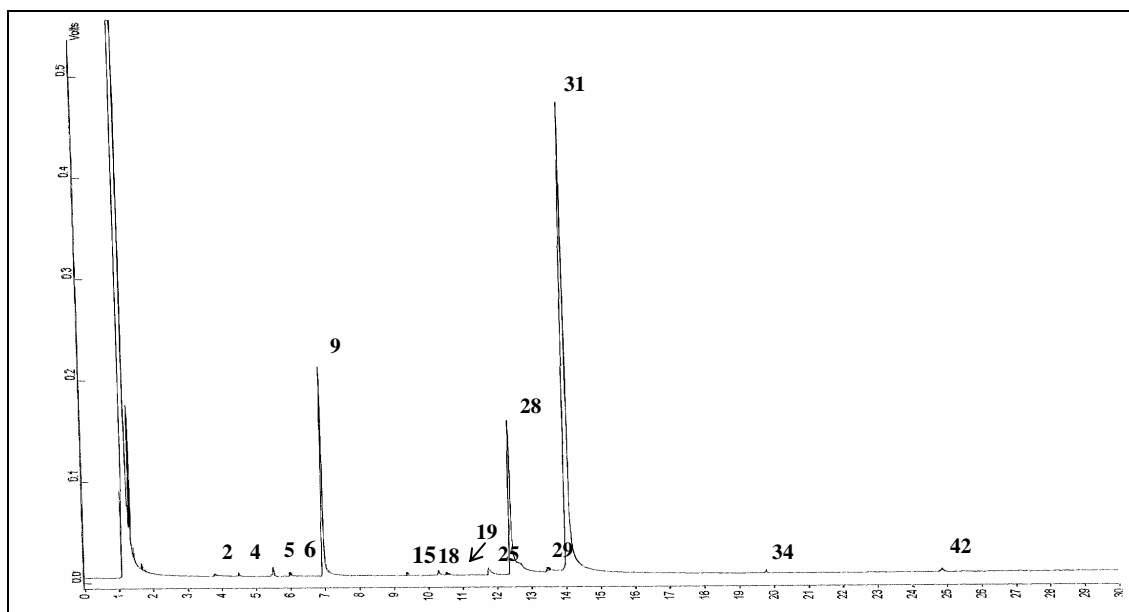


Figura 10. Perfil cromatográfico do óleo das folhas de *P. latifolia* nativa na primavera (A). Utilizando coluna SE-54, CCSF de 25 m. Programa de análise: $T_{\text{inicial}} = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{final}} = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$, rampa de $4\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

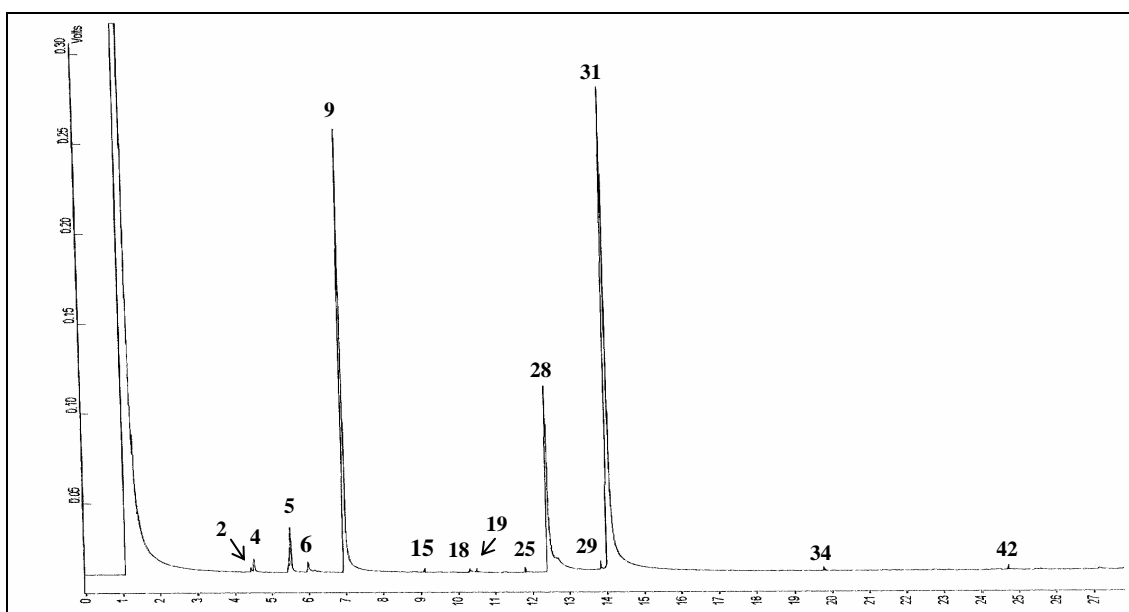


Figura 11. Perfil cromatográfico do óleo das folhas de *P. latifolia* nativa no verão (B). Utilizando coluna SE-54, CCSF de 25 m. Programa de análise: $T_{\text{inicial}} = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{final}} = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$, rampa de $4\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

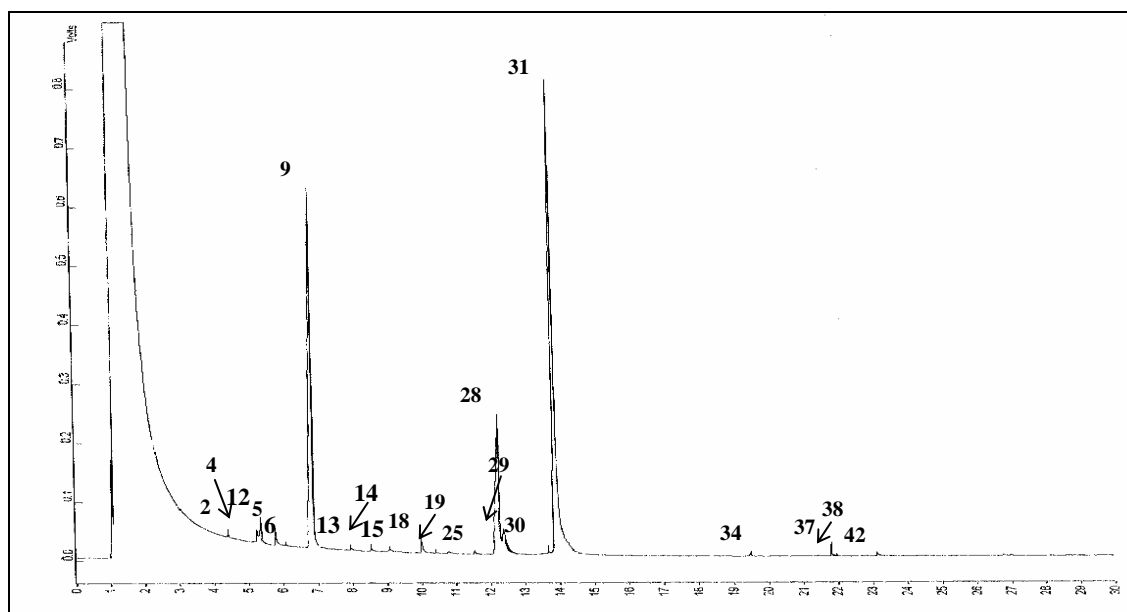


Figura 12. Perfil cromatográfico do óleo das folhas de *P. latifolia* nativa no outono (C). Utilizando coluna SE-54, CCSF de 25 m. Programa de análise: $T_{\text{inicial}} = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{final}} = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$, rampa de $4\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

Tabela 3. Composição dos óleos voláteis das folhas de *P. latifolia* nativa.

N.º	Componente ^a	IK ^b	IK ^c	IK ^d	A	B	C	Identificação
Monoterpenos hidrocarbonetos					14,71	29,58	17,53	
01	α -tujeno	931	946	1030	-	-	-	-
02	α -pineno	939	940	1020	0,35	0,97	0,07	CG-EM,Co
03	tuja-2,4(10)-dieno	957	959	nd	-	-	-	-
04	Sabineno	976	970	1042	0,07	0,65	0,12	CG-EM
05	β -pineno	980	975	1122	0,58	2,80	0,62	CG-EM,Co
06	β -mirreno	991	985	1160	0,19	1,06	0,02	CG-EM,Co
07	α -terpineno	1018	1015	1187	-	-	-	-
08	<i>para</i> -cimeno	1026	1023	1275	-	-	-	-
09	Limoneno	1031	1018	1206	13,52	24,10	16,70	CG-EM,Co
10	<i>cis</i> - β -ocimeno	1040	1041	1235	-	-	-	-
11	<i>trans</i> - β -ocimeno	1050	1044	1253	-	-	-	-
Monoterpenos oxigenados					84,12	69,58	80,75	
12	1-octen-3-ol	978	973	1113	-	-	0,50	CG-EM,Co
13	<i>cis</i> -sabineno-hidrato	1068	1056	1199	-	0,16	0,10	CG-EM
14	<i>trans</i> -sabineno-hidrato	1097	1078	1210	-	0,17	0,10	CG-EM
15	Linalol	1098	1090	1252	0,12	0,09	0,13	CG-EM,Co
16	α -tujona	1102	1100	1407	-	-	-	-
17	β -tujona	1114	1113	1425	-	-	-	-
18	<i>cis</i> -óxido de limoneno	1134	1123	1430	0,43	0,52	0,50	CG-EM
19	<i>trans</i> -óxido de limoneno	1139	1137	nd	0,19	-	0,10	CG-EM
20	Cânfora	1144	1143	1518	-	-	-	-

21	3-isotujanol	1149	1149	nd	-	-	-	-
22	Citronelal	1153	1171	1453	-	-	-	-
23	Pinocarvona	1158	1160	nd	-	-	-	-
24	<i>cis</i> -pinocanfona	1173	1170	nd	-	-	-	-
25	terpinen-4-ol	1177	1179	1460	0,93	0,14	-	CG-EM,Co
26	α -terpineol	1189	1190	1492	-	-	-	-
27	<i>cis</i> -dihidrocarvona	1193	1187	1588	-	1,30	-	CG-EM
28	<i>trans</i>-dihidrocarvona	1200	1193	1595	17,53	15,30	8,10	CG-EM,Co
29	<i>trans</i> -carveol	1217	1201	1604	0,87	0,90	1,50	CG-EM
30	<i>cis</i> -carveol	1229	1229	1679	-	-	0,22	CG-EM
31	Carvona	1242	1234	1713	64,05	51,00	69,50	CG-EM,Co
Sesquiterpenos hidrocarbonetos					0,20	0,10	1,30	
32	β -cubebeno	1390	1392	nd	-	-	-	-
33	β -elemeno	1391	1393	nd	-	-	-	-
34	β -cariofileno	1418	1430	1888	0,20	0,10	0,07	CG-EM
35	β -farneseno	1458	1460	1671	-	-	-	-
36	Aloaromadendreno	1461	1477	nd	-	-	-	-
37	germacreno-D	1480	1488	nd	-	-	1,21	CG-EM,Co
38	Biciclogermacreno	1494	1496	1718	-	-	0,02	CG-EM
39	β -bisaboleno	1508	1509	nd	-	-	-	-
Sesquiterpenos oxigenados					0,16	0,20	0,05	
40	nerolidol- <i>E</i>	1564	1560	nd	-	-	-	-
41	Espatuleno	1576	1584	2110	-	-	-	-
42	óxido de cariofileno	1581	1580	1954	0,16	0,20	0,05	CG-EM,Co
43	τ -cadinol	1640	1646	nd	-	-	-	-
44	τ -muurulol	1641	1649	nd	-	-	-	-
45	α -cadinol	1653	1655	nd	-	-	-	-
TOTAL					99,19	99,46	99,63	

^a Componentes listados em ordem de eluição na coluna SE-54; ^b Índice de Kovats da literatura; ^c Índice de Kovats na coluna SE-54; ^d Índice de Kovats na coluna PEG-20M; **nd**: não determinado; **Co**: co-injeção com padrões autênticos. **A**= coleta realizada na primavera; **B**= coleta realizada no verão; **C**= coleta realizada no outono.

De acordo com a Tabela 3, a análise cromatográfica indicou que o óleo das folhas de *P. latifolia* nativa é basicamente composto por monoterpenos (98-99%), sendo em sua maioria, monoterpenos oxigenados (69-84%).

O componente majoritário (51-69%) foi separado por purificação cromatográfica em placa preparativa (CCDP) que segundo análise por CG, com 98% de pureza.

Determinação estrutural

Submetido a CG-EM, o componente majoritário apresentou íon molecular $[M]^+$ com m/z de 150 (11%), além de fragmentos de m/z 108 (38%), 93 (39%), 82 (100%) e 54 (37%) (Figura 13), que em combinação com dados de ressonância magnética nuclear de H

e ^{13}C , (Figuras 14, 15 e 16 e Tabela 4), sugeriram a fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$ para este componente, sendo este então identificado como o monoterpene **carvona (31)**.

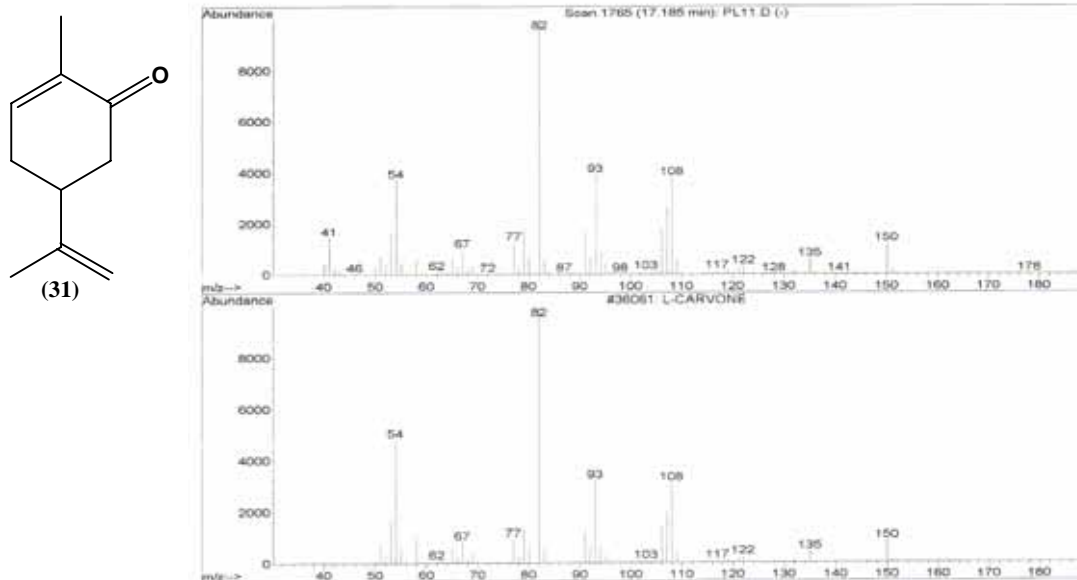


Figura 13. Espectro de massas do componente majoritário do óleo das folhas de *P. latifolia* nativa.

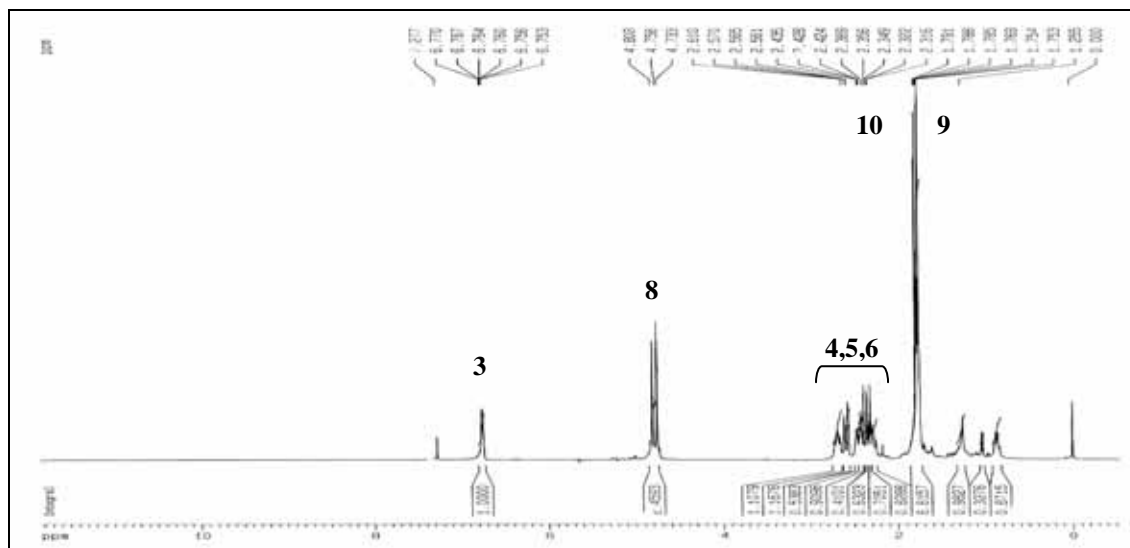


Figura 14. Espectros de RMN de H da carvona (31).

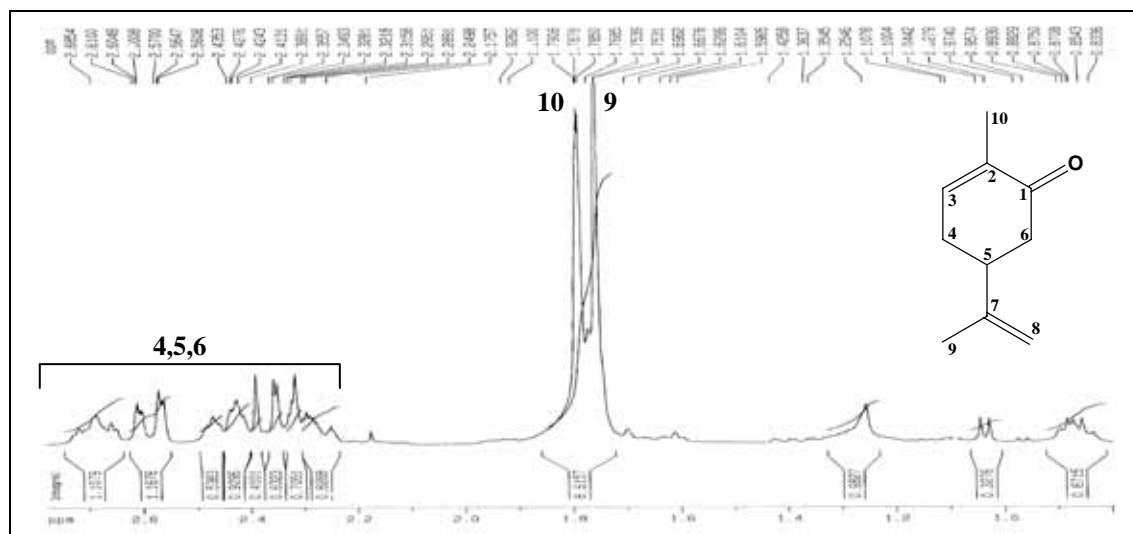


Figura 15. Expansão do espectro de RMN de H da carvona (31), entre 1,00 e 2,6 ppm.

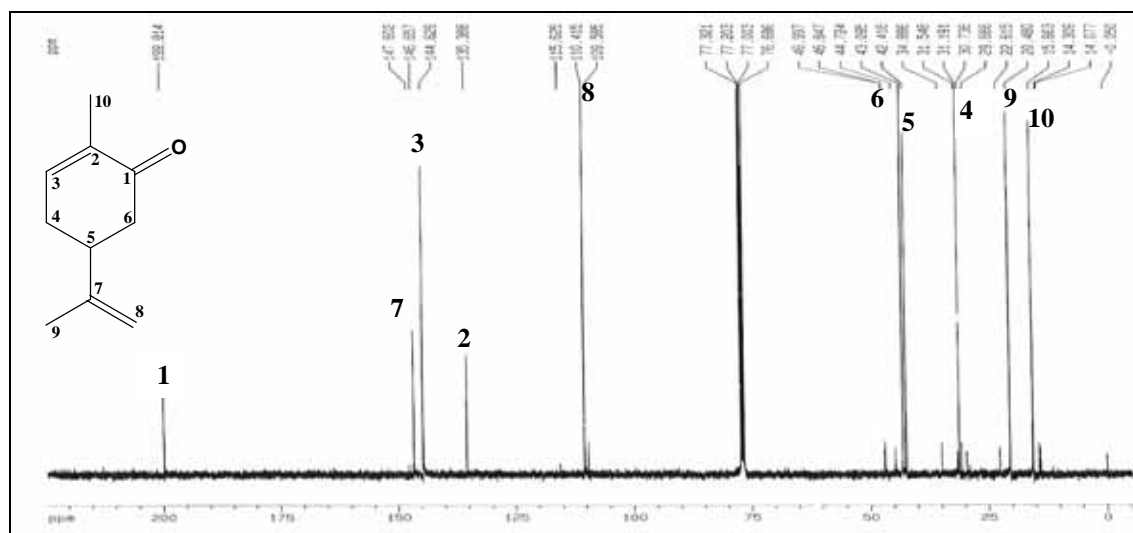


Figura 16. Espectros de RMN de ^{13}C da carvona (31).

Tabela 4. Deslocamentos químicos de RMN de H e ^{13}C da carvona (31), em CDCl_3 .

Posição	δH (ppm)	$\delta ^{13}\text{C}$ (ppm)
1	-	199,8
2	-	135,4
3	6,76 (t)	144,6
4	2,39 (m)	31,2
5	2,58 (d/d)	42,4
6	2,68 (m)	43,1
7	-	147,6
8	4,76 (d)	110,4
9	1,75 (s)	20,5
10	1,79 (d)	15,7

Os dois outros constituintes majoritários **limoneno (9)** e **trans-dihidrocarvona (28)** foram identificados por co-injeção com padrões autênticos e pelos espectros de massas obtidos (Figuras 17 e 18).

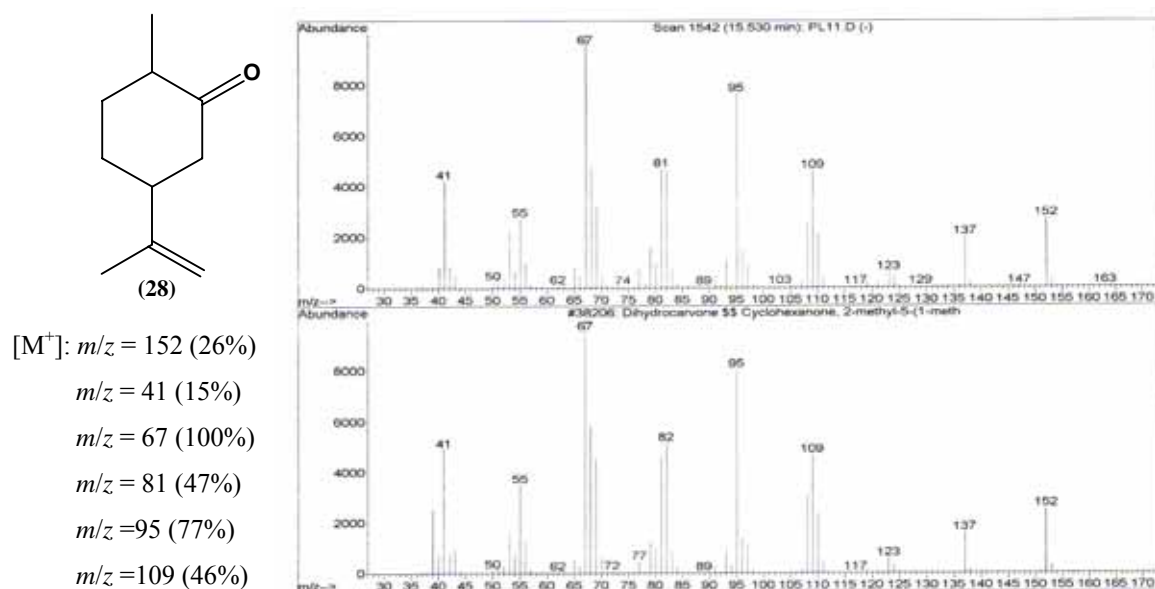


Figura 17. Espectro de massas da *trans*-dihidrocarvona encontrada no óleo das folhas de *P. latifolia* nativa.

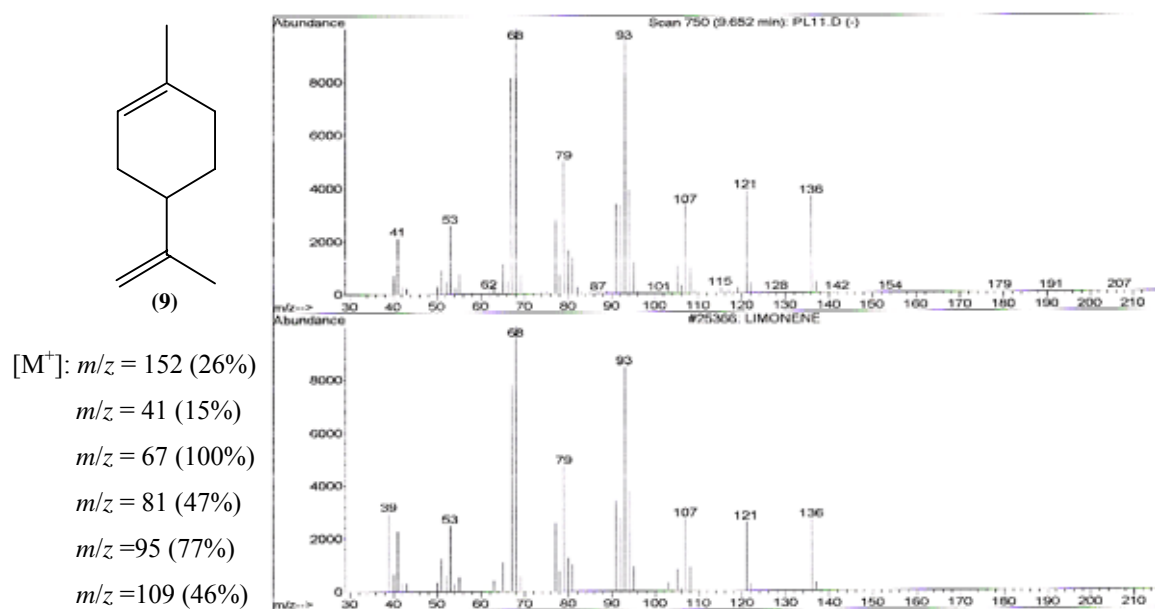


Figura 8. Espectro de massas do limoneno encontrado no óleo das folhas de *P. latifolia* nativa.

A análise sazonal demonstrou um comportamento relativamente estável na composição monoterpênica do óleo, havendo algumas modificações nos teores dos constituintes principais. Na fase crescimento e floração da planta (primavera) constatou-se uma concentração de carvona bastante acentuada, enquanto as concentrações de limoneno e *trans*-dihidrocarvona sofreram pequena alteração. Com a chegada do verão, e o início da formação de frutos, ocorre um decréscimo da concentração de carvona e um aumento na mesma proporção principalmente do terpeno limoneno. Pelo gráfico a seguir (Figura 19), pode-se observar que a modificação da constituição acompanha as fases de desenvolvimento da espécie, já que a concentração dos monoterpenos limoneno e *trans*-dihidrocarvona diminuem enquanto aumenta a concentração do monoterpeneo carvona. Esta modificação pode ser explicada pela a rota de biossíntese da carvona onde o limoneno sofre reações de oxidação levando a carvona, sendo que a *trans*-dihidrocarvona pode então ser um dos intermediários destas transformações⁹³.

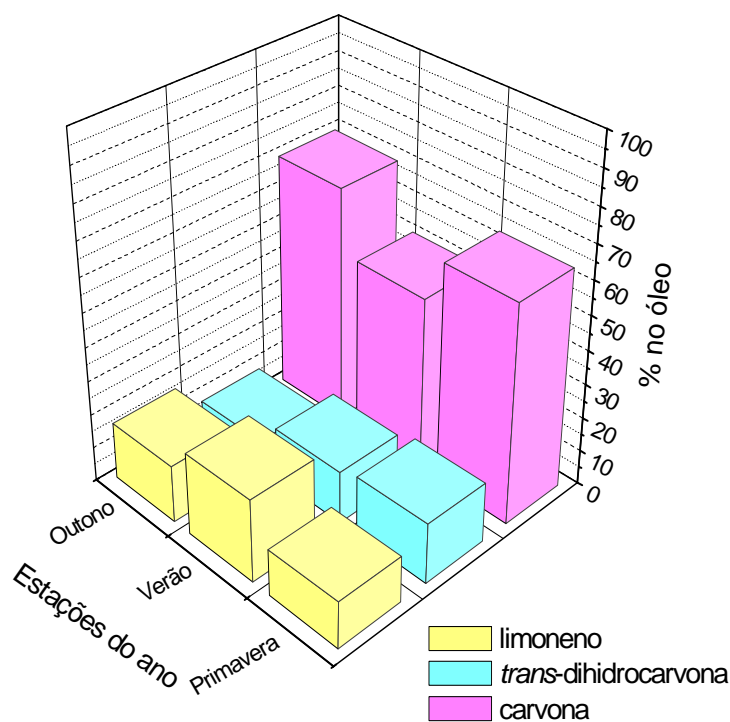


Figura 19. Representação gráfica da variação sazonal dos três principais constituintes do óleo das folhas de *P. latifolia* nativa.

5.2.2 Estudo do óleo volátil de flores de *Poiretia latifolia* nativa.

As flores de *Poiretia latifolia* nativa foram coletadas no período de 2001 a 2003, entre os meses de novembro e dezembro, época de floração da espécie, e submetidas à extração por hidrodestilação utilizando aparelho de “Clevenger” modificado. Após a extração, o óleo foi submetido à análise cromatográfica, conforme ilustra a Figura 20 e a Tabela 5, sendo a numeração dos constituintes apresentada nos cromatogramas corresponde à numeração dos mesmos na Tabela.

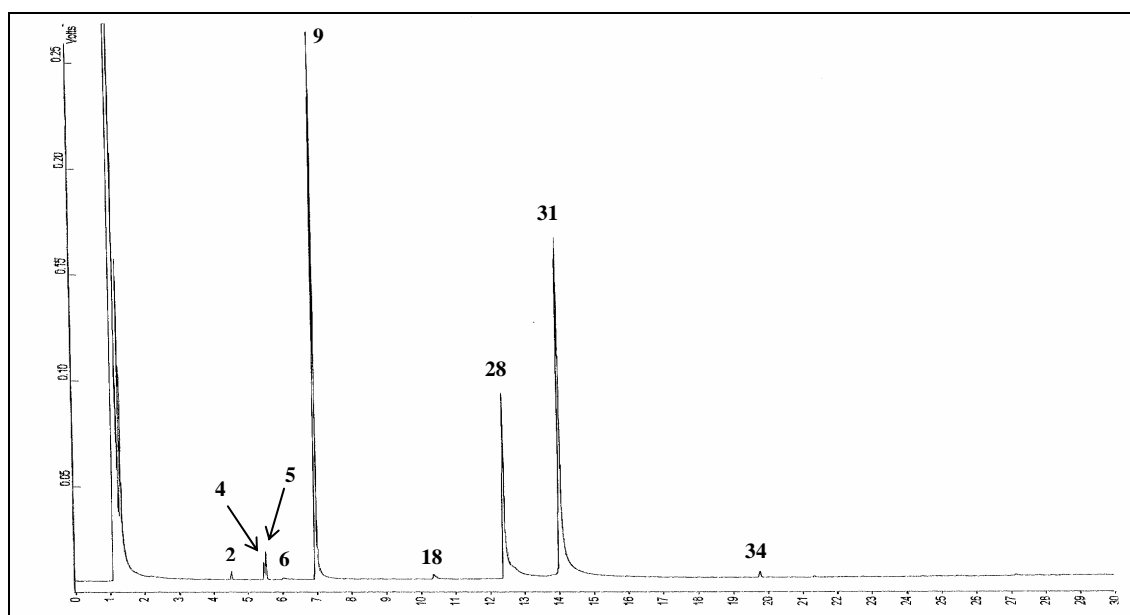


Figura 20. Perfil cromatográfico óleo volátil de flores de *P. latifolia* nativa, coletada em 2002 (B). Utilizando coluna SE-54, CCSF de 25 m x 0,25 mm. Programa de análise: $T_{\text{inicial}} = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{final}} = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$, rampa de $4\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

A análise por CG revelou que o óleo das flores é quase totalmente formado por monoterpenos (98%), sendo a maior parte, monoterpenos oxigenados (51-82%). Pode-se observar na Tabela 5 que o perfil do óleo das flores foi um tanto diferenciado do perfil do óleo das folhas do mesmo espécime. Os principais constituintes continuam os mesmos, porém ocorre uma considerável modificação nas concentrações: limoneno (15-40%), *trans*-dihidrocarvona (22-77%) e carvona (4-37%).

Tabela 5. Composição dos óleos voláteis das flores de *P. latifolia* nativa.

N.º	Componente ^a	IK ^b	IK ^c	IK ^d	A	B	C	Identificação
Monoterpenos hidrocarbonetos					45,72	38,72	16,33	
01	α -tujeno	931	946	1030	-	-	-	-
02	α -pineno	939	940	1020	0,10	0,51	0,10	CG-EM,Co
03	tuja-2,4(10)-dieno	957	959	nd	-	-	-	-
04	sabineno	976	970	1042	1,06	0,30	0,63	CG-EM
05	β -pineno	980	975	1122	2,58	1,60	-	CG-EM,Co
06	β -mirceno	991	985	1160	1,08	0,31	-	CG-EM,Co
07	α -terpineno	1018	1015	1187	-	-	-	-
08	<i>para</i> -cimeno	1026	1023	1275	-	-	-	-
09	limoneno	1031	1018	1206	40,90	36,00	15,60	CG-EM,Co
10	<i>cis</i> - β -ocimeno	1040	1041	1235	-	-	-	-
11	<i>trans</i> - β -ocimeno	1050	1044	1253	-	-	-	-
Monoterpenos oxigenados					53,11	60,00	82,30	
12	1-octen-3-ol	978	973	1113	0,55	-	-	CG-EM,Co
13	<i>cis</i> -sabineno-hidrato	1068	1056	1199	0,03	-	-	CG-EM
14	<i>trans</i> -sabineno-hidrato	1097	1078	1210	0,04	-	-	CG-EM
15	linalol	1098	1090	1252	0,11	-	-	CG-EM,Co
16	α -tujona	1102	1100	1401	-	-	-	-
17	β -tujona	1114	1113	1425	-	-	-	-
18	<i>cis</i> -óxido de limoneno	1134	1123	1430	-	0,20	-	CG-EM
19	<i>trans</i> -óxido de limoneno	1139	1137	nd	-	-	-	-
20	cânfora	1144	1143	1518	-	-	-	-
21	3-isotujanol	1149	1149	nd	-	-	-	-
22	citronelal	1153	1171	1453	0,31	-	-	CG-EM,Co
23	pinocarvona	1158	1160	nd	-	-	-	-
24	<i>cis</i> -pinocanfona	1173	1170	nd	-	-	-	-
25	terpinen-4-ol	1177	1179	1460	-	-	-	-
26	α -terpineol	1189	1190	1492	-	-	-	-
27	<i>cis</i> -dihidrocarvona	1193	1187	1588	-	-	-	-
28	<i>trans</i>-dihidrocarvona	1200	1193	1595	22,10	22,40	77,80	CG-EM,Co
29	<i>trans</i> -carveol	1217	1201	1604	0,14	-	-	CG-EM
30	<i>cis</i> -carveol	1229	1229	1679	0,50	-	-	CG-EM
31	carvona	1242	1234	1713	29,30	37,40	4,50	CG-EM,Co
Sesquiterpenos hidrocarbonetos					0,45	0,55	0,60	
32	β -cubebeno	1390	1392	nd	-	-	-	-
33	β -elemeno	1391	1393	nd	-	-	-	-
34	β -cariofileno	1418	1430	1888	0,45	0,55	0,60	CG-EM
35	β -farneseno	1458	1460	1671	-	-	-	-
36	Aloaromadendreno	1461	1477	nd	-	-	-	-
37	germacreno-D	1480	1488	nd	-	-	-	-
38	biciclogermacreno	1494	1496	1718	-	-	-	-
39	β -bisaboleno	1508	1509	nd	-	-	-	-
Sesquiterpenos oxigenados					-	-	-	
40	nerolidol- <i>E</i>	1564	1560	nd	-	-	-	-
41	espatulenol	1576	1584	2110	-	-	-	-

42	óxido de cariofileno	1581	1580	1954	-	-	-	-
43	τ -cadinol	1640	1646	nd	-	-	-	-
44	τ -muurulol	1641	1649	nd	-	-	-	-
45	α -cadinol	1653	1655	nd	-	-	-	-
TOTAL					99,46	99,27	99,23	

^a Componentes listados em ordem de eluição na coluna SE-54; ^b Índice de Kovats da literatura; ^c Índice de Kovats na coluna SE-54; ^d Índice de Kovats na coluna PEG-20M; nd: não determinado; Co: co-injeção com padrões autênticos. **A**= coleta realizada em 2001; **B**= coleta realizada em 2002; **C**= coleta realizada em 2003.

O acompanhamento anual da época de floração demonstrou uma mudança considerável nas concentrações dos constituintes majoritários e também o desaparecimento de alguns dos constituintes minoritários entre os períodos de coleta, sendo que tais modificações podem ser explicadas por fatores relacionados ao ambiente externo, como: quantidade de chuva no período, competição com outras espécies nativas e o ataque de pragas (insetos, microorganismos, etc.)¹⁵⁴.

Durante as coletas efetuadas, foi possível observar certas mudanças importantes como no período de coleta de 2002, onde a espécie estava sendo atacada por formigas cortadeiras, o que pode ter levado ao aumento na concentração do monoterpene carvona e o desaparecimento de constituintes minoritários, já que este constituinte pode estar relacionado com o mecanismo de defesa da planta⁸⁵. Já no período de coleta de 2003, foi realizada apenas uma coleta no final da floração, sendo que os exemplares encontravam-se em estado prematuro de desenvolvimento, já que a área de coleta havia sido podada antes deste período; sendo assim, a amostra não foi representativa. Isto pode explicar a grande diferença nas concentrações dos constituintes, onde o óleo apresentou uma alta concentração de *trans*-dihidrocarvona (77,8%) e uma concentração extremamente baixa de carvona (4,5%).

Acredita-se que tais fatores foram os responsáveis não só pela grande variação de composição do óleo volátil das flores, mas também de algumas das variações ocorridas nos óleos das folhas de *P. latifolia* nativa. Principalmente nas concentrações dos constituintes majoritários, pois estes devem estar diretamente ligados aos mecanismos de proteção e desenvolvimento da espécie¹⁵⁵.

¹⁵⁴ ANDRADE, A. M., GOMES, S. S. Influência de alguns fatores não genéticos sobre o teor de óleo essencial em folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. **Floresta e Ambiente**, v. 1, n.7, p. 181-189, 2000.

¹⁵⁵ PICHESSKY, E., GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, V. 5, p. 237-243, 2002.

5.2.3 Determinação dos constituintes do óleo das folhas de *P. latifolia* cultivada.

A amostra de *P latifolia* do Jardim Botânico é denominada de “cultivada” por se tratar do transplante de alguns exemplares da amostra de *P. latifolia* nativa de Santa Maria.

Os óleos voláteis das folhas desta espécie de *P. latifolia* foram analisados por cromatografia, o que possibilitou a identificação da maioria dos seus componentes. Estes dados fazem parte da Tabela 6, sendo que a numeração dos constituintes nesta Tabela foi utilizada para identificar os principais constituintes nos respectivos cromatogramas dos óleos.

Tabela 6. Variação da composição dos óleos voláteis das folhas de *P. latifolia* cultivada.

N. °	Componente ^a	IK ^b	IK ^c	IK ^d	A	B	C	D	Identificação
Monoterpenos hidrocarbonetos					8,29	32,3	29,96	38,87	
01	α -tujeno	931	946	1030	0,08	0,05	0,15	0,27	CG-EM,Co
02	α -pineno	939	940	1020	0,06	0,84	0,60	0,55	CG-EM,Co
03	tuja-2,4(10)-dieno	957	959	nd	0,10	0,02	-	0,80	CG-EM
04	sabineno	976	970	1042	3,54	0,40	3,30	1,70	CG-EM
05	β -pineno	980	975	1122	0,06	2,53	2,11	0,11	CG-EM,Co
06	β -mirceno	991	985	1160	0,30	0,65	0,60	0,64	CG-EM,Co
07	α -terpineno	1018	1015	1187	-	0,21	0,10	9,10	CG-EM,Co
08	<i>para</i> -cimeno	1026	1023	1275	-	-	-	-	-
09	limoneno	1031	1018	1206	4,15	27,60	23,10	25,70	CG-EM,Co
10	<i>cis</i> - β -ocimeno	1040	1041	1235	-	-	-	-	-
11	<i>trans</i> - β -ocimeno	1050	1044	1253	-	-	-	-	-
Monoterpenos oxigenados					90,65	66,94	68,14	60,20	
12	1-octen-3-ol	978	973	1113	-	-	-	-	-
13	<i>cis</i> -sabineno-hidrato	1068	1056	1199	0,20	0,03	-	0,02	CG-EM
14	<i>trans</i> -sabineno-hidrato	1097	1078	1210	-	-	-	-	-
15	linalol	1098	1090	1252	-	-	-	-	-
16	α-tujona	1102	1100	1401	11,43	0,25	3,60	0,20	CG-EM,Co
17	β-tujona	1114	1113	1425	55,67	0,3	16,1	0,11	CG-EM,Co
18	<i>cis</i> -óxido de limoneno	1134	1123	1430	-	-	-	-	-
19	<i>trans</i> -óxido de limoneno	1139	1137	nd	-	-	-	-	-
20	cânfora	1144	1143	1518	2,01	-	0,20	0,30	CG-EM,Co
21	3-isotujanol	1149	1149	nd	1,00	-	-	-	CG-EM
22	citronelal	1153	1171	1453	-	-	-	-	-
23	pinocarvona	1158	1160	nd	0,06	-	0,30	0,02	CG-EM
24	<i>cis</i> -pinocanfona	1173	1170	nd	1,01	-	-	0,01	CG-EM
25	terpinen-4-ol	1177	1179	1460	0,24	0,02	0,10	-	CG-EM,Co
26	α -terpineol	1189	1190	1492	0,42	0,23	0,09	0,29	CG-EM,Co
27	<i>cis</i> -dihidrocarvona	1193	1187	1588	-	-	-	-	-

28	<i>trans</i>-dihidrocarvona	1200	1193	1595	0,24	0,66	0,30	0,63	CG-EM,Co
29	<i>trans</i> -carveol	1217	1201	1604	0,40	1,35	0,05	0,92	CG-EM
30	<i>cis</i> -carveol	1229	1229	1679	-	-	-	-	-
31	carvona	1242	1234	1713	17,97	64,10	47,4	57,7	CG-EM,Co
Sesquiterpenos hidrocarbonetos					0,52	0,21	0,55	0,21	
32	β -cubebeno	1390	1392	nd	0,06	-	-	-	CG-EM
33	β -elemeno	1391	1393	nd	-	-	-	-	-
34	β -cariofileno	1418	1430	1888	0,30	0,10	0,15	0,11	CG-EM,Co
35	β -farneseno	1458	1460	1671	-	-	-	-	-
36	aloaromadendreno	1461	1477	nd	-	-	-	-	-
37	germacreno-D	1480	1488	nd	0,07	0,05	0,10	0,03	CG-EM,Co
38	biciclogermacreno	1494	1496	1718	0,09	0,06	0,30	0,07	CG-EM,Co
39	β -bisaboleno	1508	1509	nd	-	-	-	-	-
Sesquiterpenos oxigenados					0,20	0,30	0,25	0,07	
40	nerolidol- <i>E</i>	1564	1560	nd	-	-	-	-	-
41	espatulenol	1576	1584	2110	-	-	-	-	-
42	óxido de cariofileno	1581	1580	1954	-	-	-	-	-
43	τ -cadinol	1640	1646	nd	-	-	-	-	-
44	τ -muurulol	1641	1649	nd	-	-	-	-	-
45	α -cadinol	1653	1655	nd	0,20	0,30	0,25	0,07	CG-EM,Co
TOTAL					99,66	99,75	98,90	99,35	

^a Componentes listados em ordem de eluição na coluna SE-54; ^b Índice de Kovats da literatura; ^c Índice de Kovats na coluna SE-54; ^d Índice de Kovats na coluna PEG-20M; nd: não determinado; Co: co-injeção com padrões autênticos. **A**= coleta logo após o transplante; **B**= coleta realizada na primavera; **C**= coleta realizada no verão; **D**= coleta realizada no outono.

Logo após o período de desenvolvimento, realizou-se a primeira coleta das folhas de *P. latifolia*, no período do verão. A análise cromatográfica demonstrou uma constituição química bastante diferente da encontrada no espécime de *P. latifolia* nativa. De acordo com a Tabela 6, amostra **A** e Figura 21, a composição do óleo volátil continua sendo basicamente monoterpênica (98%) sendo a maioria monoterpenos oxigenados (90%). Os terpenos limoneno (**9**), *trans*-dihidrocarvona (**28**) e carvona (**31**) continuam presentes na amostra, mas agora em concentrações bem inferiores (4,15%; 0,24%; 18%, respectivamente). Houve o aparecimento de dois novos componentes majoritários nas concentrações de 56% e 11%.

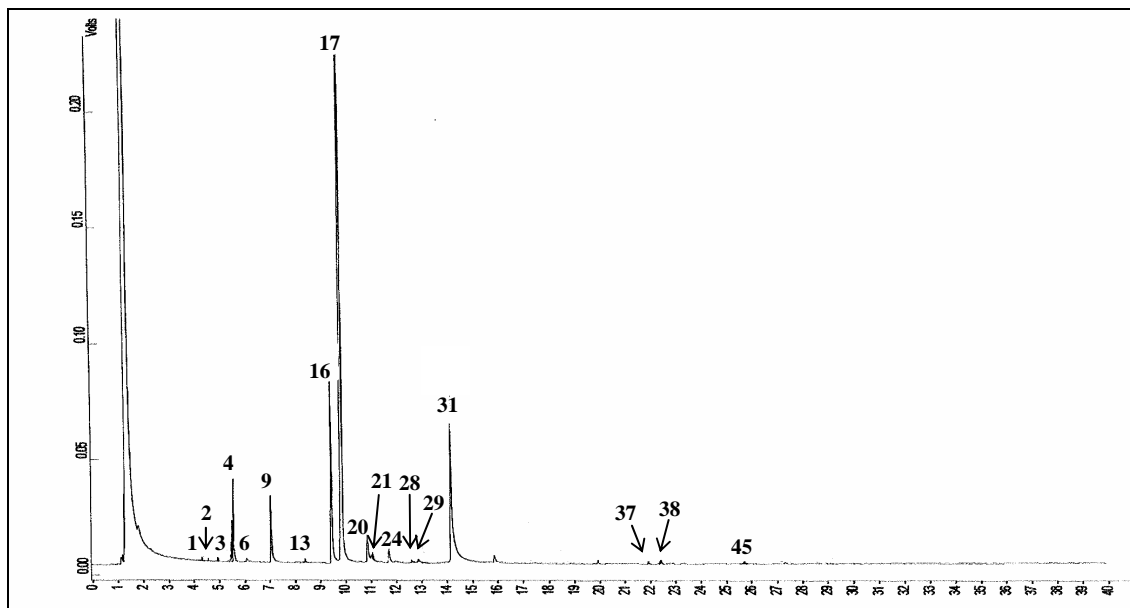


Figura 21. Perfil cromatográfico óleo volátil de folhas de *P. latifolia* cultivada, coletada após o transplante (A). Utilizando coluna SE-54, CCSF de 25 m x 0,25 mm. Programa de análise: $T_{\text{inicial}} = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{final}} = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$, rampa de $4\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

Determinação estrutural

Submetido a CG-EM, o componente majoritário (55,7%) apresentou íon molecular $[M]^+$ com m/z de 152, além de fragmentos de m/z 41 (53%), 67 (100%), 81 (100%), 95 (81%) e 110 (64%) e comparando-se o IK obtido com os encontrados na literatura, a fórmula molecular $C_{10}H_{16}O$ foi sugerida para este componente, sendo este então identificado como o monoterpene **β -tujona (17)**, como mostra a Figura 22.

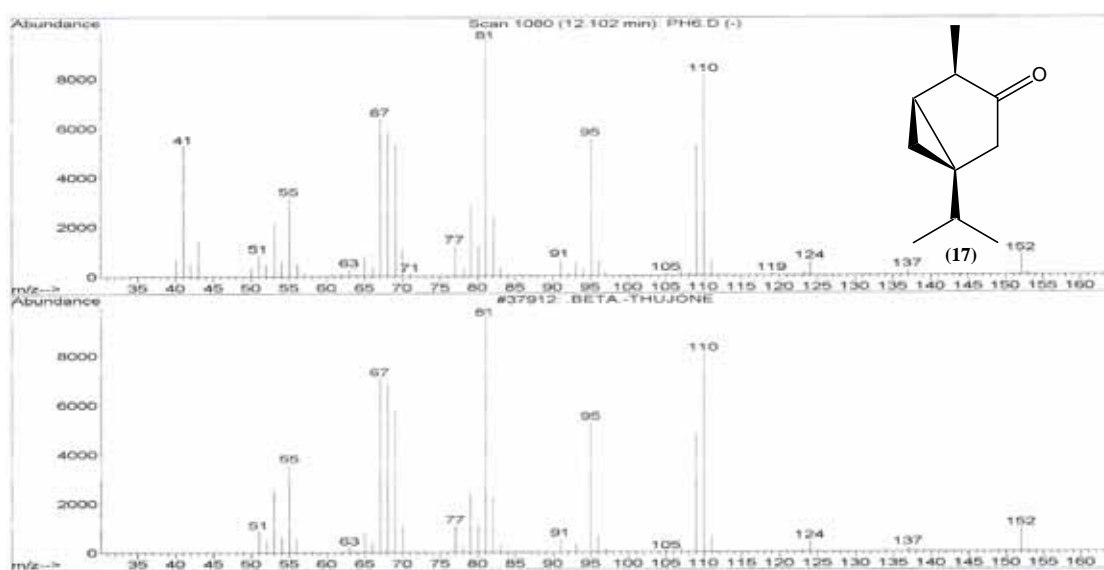


Figura 22. Espectro de massas da β -tujona encontrada no óleo das folhas de *P. latifolia* cultivada, amostra A.

O outro constituinte em concentração expressiva, que ainda não havia sido observado, também foi identificado por co-injeção com padrão autêntico e pelo espectro de massas obtido (Figura 23), como sendo a α -tujona (**16**).

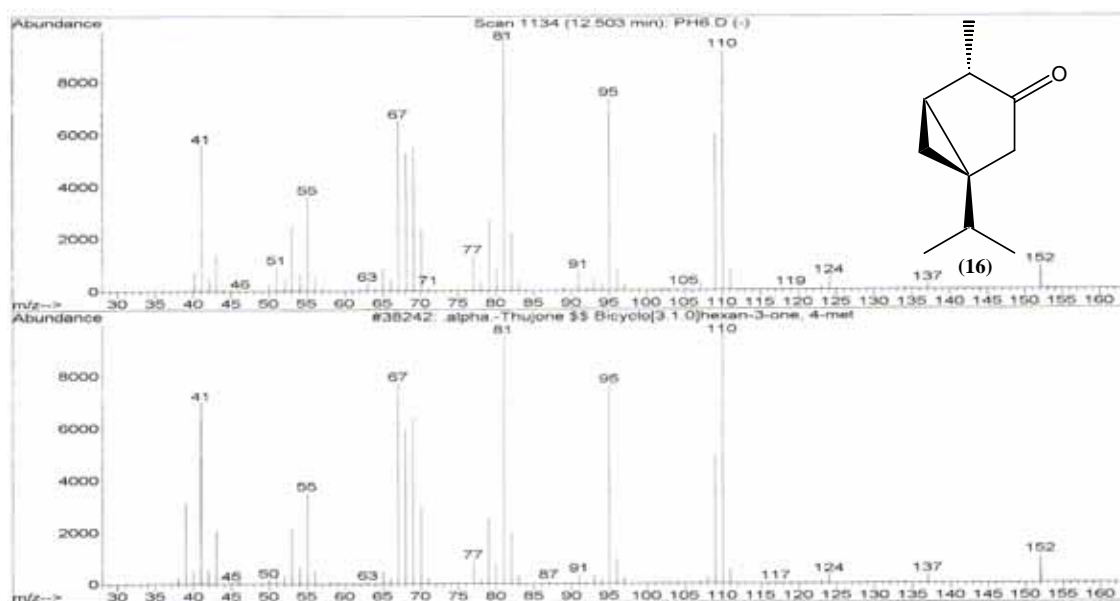


Figura 23. Espectro de massas da α -tujona encontrada no óleo das folhas de *P. latifolia* cultivada, amostra A.

Esta constituição diferenciada pode ser explicada pela modificação do habitat da espécie, pois a mesma foi inserida em um canteiro de solo fértil, regularmente adubado, ausente de outras espécies vegetais e nem insetos predadores, tendo ainda grande disponibilidade de água. Esta condição pode ter causado um período de adaptação da planta, modificando seu metabolismo durante a fase de crescimento e desenvolvimento¹⁵⁶.

Após o período adaptativo, a espécie voltou a apresentar um perfil semelhante ao apresentado pelo óleo volátil da espécie nativa (Tabela 6, **B,C** e **D**). Os monoterpenos continuaram sendo majoritários (98%), e os monoterpenos oxigenados perfazendo 60-67% desta constituição, como mostra as Figuras 24, 25 e 26. Os constituintes majoritários voltaram a ser os terpenos carvona (**31**) (47-64%), limoneno(**9**) (23-27%), entretanto,

¹⁵⁶ FUENTE, E.B., GIL, A., LENARDIS, A. E., et al. Response of winter crops differing in grain yield and essential oil production to some agronomic practices and environmental gradient in the Rollig Pampa, Argentina. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 99, p. 159-169, 2003.

houve uma diminuição nos teores de *trans*-dihidrocarvona (**28**) (0,3-0,6%) e os monoterpenos α - e β -tujona (**16** e **17**) continuaram presentes, com modificações de concentração (0,20-3,6% e 0,11-16,10%, respectivamente).

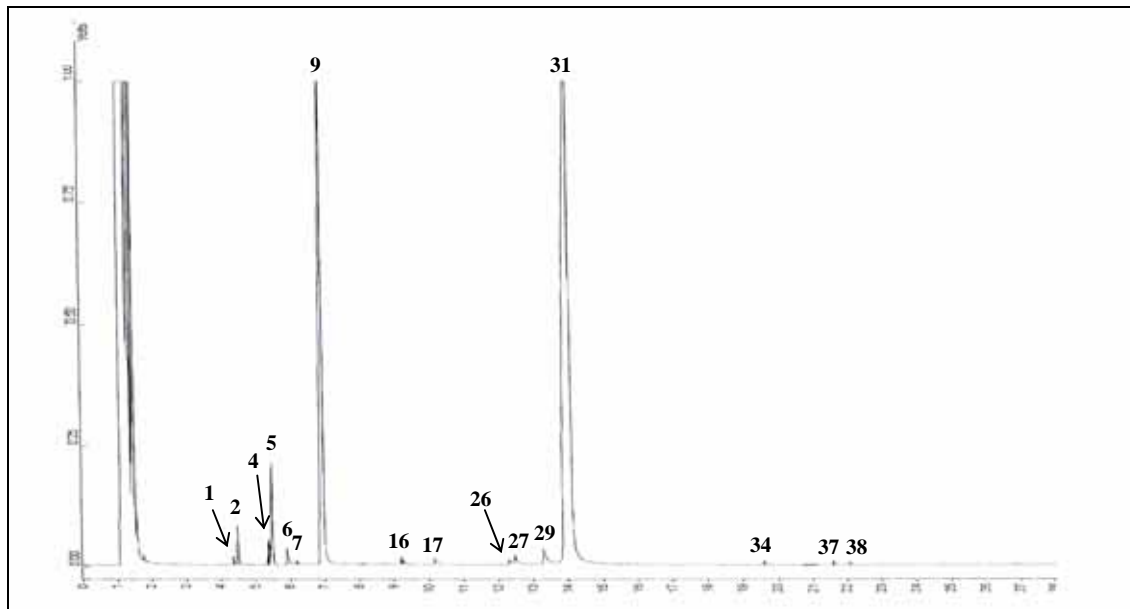


Figura 24. Perfil cromatográfico do óleo volátil das folhas de *P. latifolia* cultivada coletada na primavera (**B**). Utilizando coluna SE-54, CCSF de 25 m x 0,25 mm. Programa de análise: $T_{\text{inicial}} = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{final}} = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$, rampa de $4\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

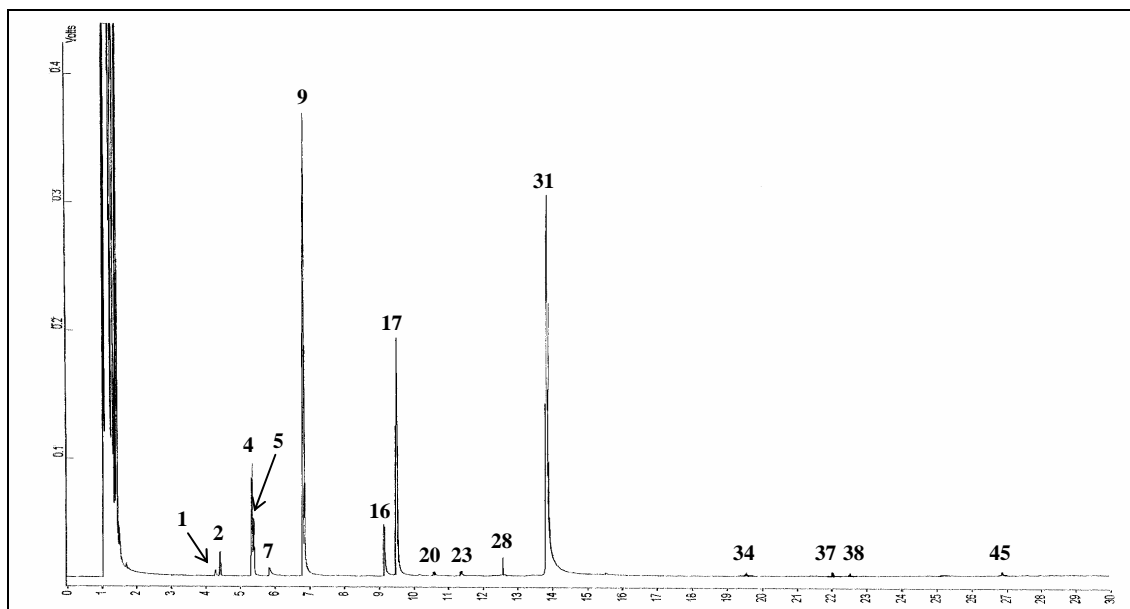


Figura 25. Perfil cromatográfico do óleo volátil das folhas de *P. latifolia* cultivada coletada no verão (**C**). Utilizando coluna SE-54, CCSF de 25 m x 0,25 mm. Programa de análise: $T_{\text{inicial}} = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{final}} = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$, rampa de $4\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

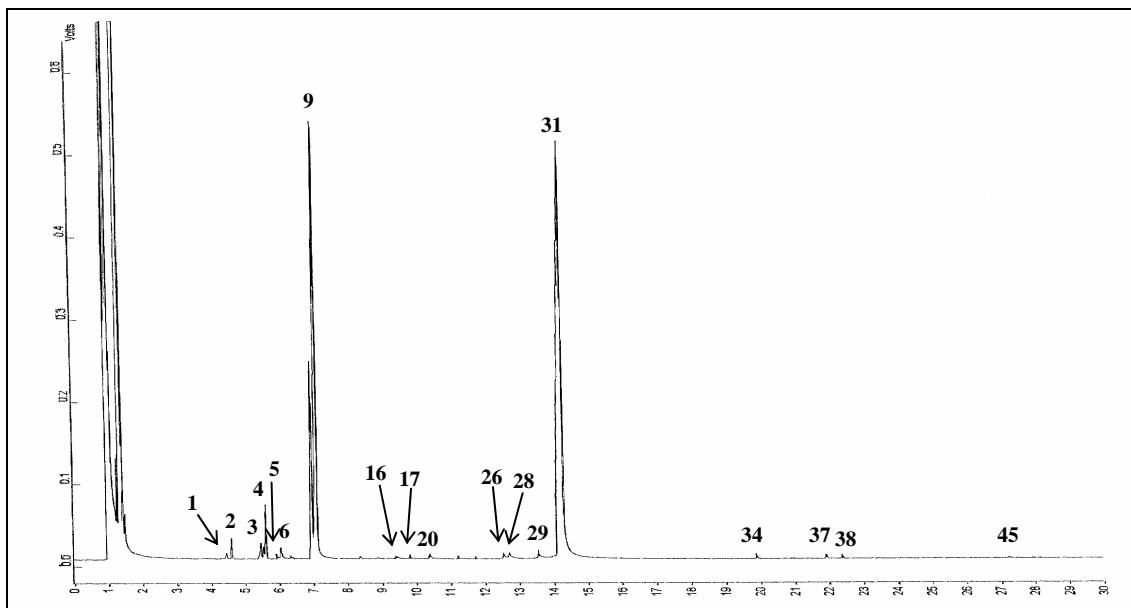


Figura 26. Perfil cromatográfico do óleo volátil das folhas de *P. latifolia* cultivada coletada no outono (D). Utilizando coluna SE-54, CCSF de 25 m x 0,25 mm. Programa de análise: $T_{\text{inicial}} = 50$ °C, $T_{\text{final}} = 250$ °C, rampa de 4 °C min^{-1} .

A análise sazonal destes óleos revelou que a constituição química permanece relativamente estável, verificando-se apenas um aumento considerável do terpeno β -tujona no período do verão (16,1%).

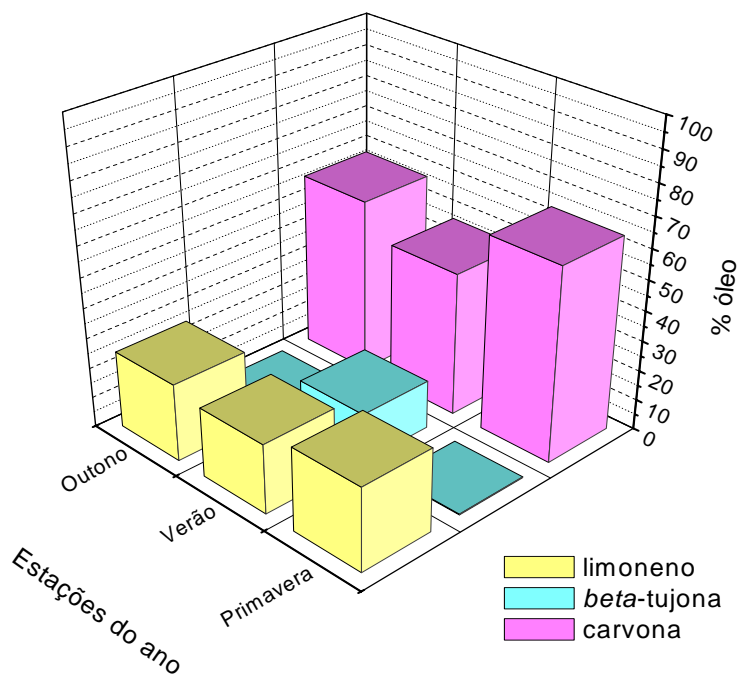


Figura 27. Representação gráfica da variação sazonal dos principais constituintes do óleo das folhas de *P. latifolia* cultivada.

5.2.3 Determinação dos constituintes do óleo das flores de *P. latifolia* cultivada.

A análise do óleo volátil das flores de *P. latifolia* cultivada foi realizada em um único período de floração, com a coleta de duas amostras, entre o início e o término da floração.

Conforme a Tabela 7, pode-se observar o mesmo perfil do óleo volátil das flores de *P. latifolia* nativa. Os monoterpenos constituem 99% da totalidade do óleo, sendo que, diferentemente da amostra nativa, os monoterpenos hidrocarbonetos perfazem 74% do óleo volátil, enquanto os monoterpenos oxigenados apenas 25%.

Tabela 7. Composição do óleo volátil das flores de *P. latifolia* cultivada.

N.º	Componente ^a	IK ^b	IK ^c	IK ^d	A	Identificação
Monoterpenos hidrocarbonetos					74,16	
01	α -tujeno	931	946	1030	0,09	CG-EM,Co
02	α -pineno	939	940	1020	1,55	CG-EM,Co
03	tuja-2,4(10)-dieno	957	959	nd	-	-
04	sabineno	976	970	1042	0,50	CG-EM
05	β-pineno	980	975	1122	3,65	CG-EM,Co
06	β -mirceno	991	985	1160	0,50	CG-EM,Co
07	α -terpineno	1018	1015	nd	0,06	CG-EM,Co
08	<i>para</i> -cimeno	1026	1023	nd	-	-
09	limoneno	1031	1018	1191	67,81	CG-EM,Co
10	<i>cis</i> - β -ocimeno	1040	1041	nd	-	-
11	<i>trans</i> - β -ocimeno	1050	1044	nd	-	-
Monoterpenos oxigenados					25,26	
12	1-octen-3-ol	978	973	1113	-	-
13	<i>cis</i> -sabineno-hidrato	1068	1056	1199	0,09	CG-EM
14	<i>trans</i> -sabineno-hidrato	1097	1078	nd	-	-
15	linalol	1098	1090	1252	-	-
16	α -tujona	1102	1100	nd	-	-
17	β -tujona	1114	1113	nd	-	-
18	<i>cis</i> -óxido de limoneno	1134	1123	1430	-	-
19	<i>trans</i> -óxido de limoneno	1139	1137	nd	-	-
20	cânfora	1144	1143	nd	-	-
21	3-isotujanol	1149	1149	nd	-	-
22	citronelal	1153	1171	1453	-	-
23	pinocarvona	1158	1160	nd	-	-
24	<i>cis</i> -pinocanfona	1173	1170	nd	-	-
25	terpinen-4-ol	1177	1179	1460	-	-
26	α -terpineol	1189	1190	nd	-	-
27	<i>cis</i> -dihidrocarvona	1193	1187	1588	-	-

28	<i>trans</i> -dihidrocarvona	1200	1193	1595	-	-
29	<i>trans</i> -carveol	1217	1201	1604	-	-
30	<i>cis</i> -carveol	1229	1229	1679	-	-
31	carvona	1242	1234	1713	25,17	CG-EM,Co
Sesquiterpenos hidrocarbonetos					0,52	
32	β -cubebeno	1390	1392	nd	-	-
33	β -elemeno	1391	1393	nd	-	-
34	β -cariofileno	1418	1430	1888	0,30	CG-EM
35	β -farneseno	1458	1460	nd	-	-
36	aloomadendreno	1461	1477	nd	-	-
37	germacreno-D	1480	1488	nd	0,15	CG-EM,Co
38	biciclogermacreno	1494	1496	1718	0,07	CG-EM,Co
39	β -bisaboleno	1508	1509	nd	-	-
Sesquiterpenos oxigenados					-	
40	nerolidol- <i>E</i>	1564	1560	nd	-	-
41	espatulenol	1576	1584	2110	-	-
42	óxido de cariofileno	1581	1580	1954	-	-
43	τ -cadinol	1640	1646	nd	-	-
44	τ -muurulol	1641	1649	nd	-	-
45	α -cadinol	1653	1655	nd	-	-
TOTAL					99,94	

^a Componentes listados em ordem de eluição na coluna SE-54; ^b Índice de Kovats da literatura; ^c Índice de Kovats na coluna SE-54; ^d Índice de Kovats na coluna PEG-20M; **nd**: não determinado; **Co**: co-injeção com padrões autênticos. **A**= coleta realizada em 2003.

Os constituintes majoritários do óleo volátil continuam os mesmos, sendo agora o terpeno limoneno (**9**) encontrada em maior quantidade (67,8%), seguido de carvona (**31**) com 25% da constituição do óleo. Não foi detectada a presença de *trans*-dihidrocarvona (**28**), nem mesmo dos monoterpenos α - e β -tujona (**16 e 17**) (Figura 28).

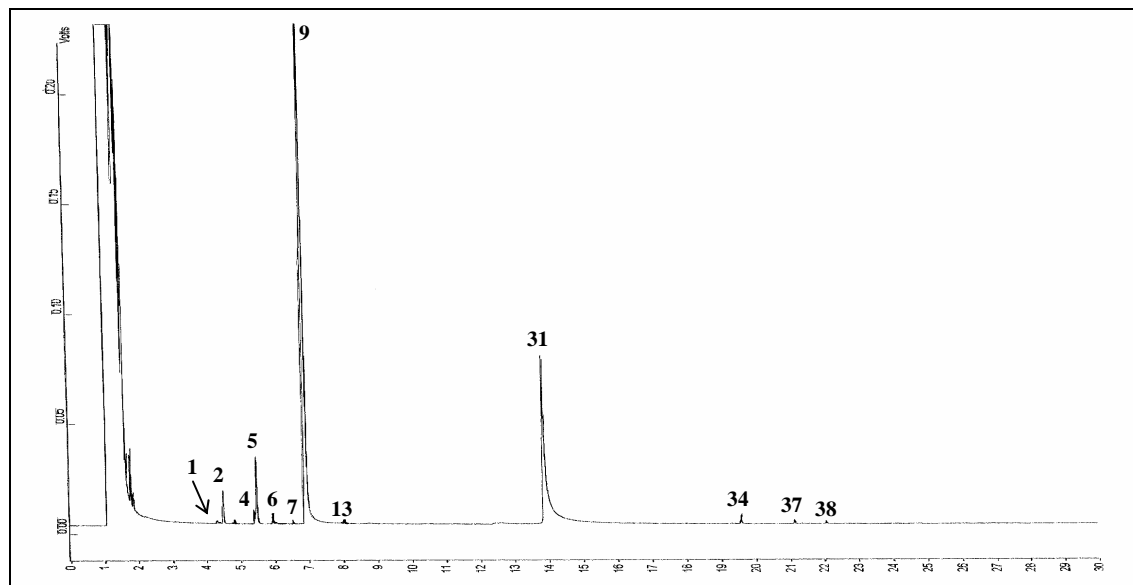


Figura 28. Perfil cromatográfico do óleo volátil das flores de *P. latifolia* cultivada. Utilizando coluna SE-54, CCSF de 25 m. Utilizando coluna SE-54, CCSF de 25 m. Programa de análise: $T_{\text{inicial}} = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{final}} = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$, rampa de $4\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

5.3 Estudo do óleo volátil de *Poiretia tetraphylla* Vog.

As folhas, juntamente com os talos de *Poiretia tetraphylla* Vog. foram coletadas e submetidas a hidrodestilação utilizando um aparelho de Clevenger modificado, obtendo-se um óleo de aspecto amarelo claro. O rendimento médio para a extração do óleo volátil das folhas foi de 0,20 %. As flores desta espécie não foram analisadas devido ao seu pequeno porte e também a pequena quantidade de planta encontrada no único ponto de coleta existente.

5.3.1 Determinação dos constituintes do óleo de folhas e talos de *P. tetraphylla*.

O óleo volátil obtido dos talos e folhas de *P. tetraphylla* foi caracterizado por cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada e espectrometria de massas sendo 30 constituintes identificados, representando cerca de 95% da constituição total dos óleos, conforme Tabela 8.

Tabela 8. Composição dos óleos voláteis de talos e folhas de *P. tetraphylla* nativa.

N.º	Componente ^a	IK ^b	IK ^c	IK ^d	A	B	C	Identificação
Monoterpenos hidrocarbonetos					28,60	22,52	29,80	
01	α -tujeno	931	946	1030	0,16	0,11	-	CG-EM,Co
02	α -pineno	939	940	1020	1,52	0,98	1,00	CG-EM,Co
03	tuja-2,4(10)-diene	957	959	nd	-	-	-	-
04	sabineno	976	970	1042	0,50	0,43	-	CG-EM
05	β-pineno	980	975	1122	9,31	5,30	7,50	CG-EM,Co
06	β -mirceno	991	985	1160	0,60	0,80	-	CG-EM,Co
07	α -terpineno	1018	1015	nd	-	-	-	-
08	<i>para</i> -cimeno	1026	1023	nd	3,74	-	3,50	CG-EM
09	limoneno	1031	1018	1191	12,70	4,20	17,8	CG-EM,Co
10	<i>cis</i> - β -ocimeno	1040	1041	nd	0,02	0,30	-	CG-EM
11	<i>trans</i> - β -ocimeno	1050	1044	nd	0,05	10,4	-	CG-EM
Monoterpenos oxigenados					2,84	4,07	-	
12	1-octen-3-ol	978	973	1113	-	-	-	-
13	<i>cis</i> -sabineno-hidrato	1068	1056	1199	-	1,40	-	CG-EM
14	<i>trans</i> -sabineno-hidrato	1097	1078	nd	-	-	-	-
15	linalol	1098	1090	1252	0,53	0,10	-	CG-EM,Co
16	α -tujona	1102	1100	nd	-	-	-	-
17	β -tujona	1114	1113	nd	-	-	-	-
18	<i>cis</i> -óxido de limoneno	1134	1123	1430	-	-	-	CG-EM
19	<i>trans</i> -óxido de limoneno	1139	1137	nd	-	-	-	-
20	cânfora	1144	1143	nd	-	-	-	-
21	3-isotujanol	1149	1149	nd	-	-	-	-
22	citronelal	1153	1171	1453	-	0,08	-	CG-EM,Co
23	pinocarvona	1158	1160	nd	-	-	-	-
24	<i>cis</i> -pinocanfona	1173	1170	nd	-	-	-	-
25	terpinen-4-ol	1177	1179	1460	-	-	-	-
26	α -terpineol	1189	1190	nd	-	-	-	-
27	<i>cis</i> -dihidrocarvona	1193	1187	1588	-	-	-	-
28	<i>trans</i> -dihidrocarvona	1200	1193	1595	0,25	0,55	-	CG-EM,Co
29	<i>trans</i> -carveol	1217	1201	1604	0,14	0,23	-	CG-EM
30	<i>cis</i> -carveol	1229	1229	1679	-	-	-	-
31	carvona	1242	1234	1713	1,92	1,71	-	CG-EM,Co
Sesquiterpenos hidrocarbonetos					38,01	35,95	18,84	
32	β -cubebeno	1390	1392	nd	2,90	0,70	0,10	CG-EM
33	β -elemeno	1391	1393	nd	1,04	2,50	2,10	CG-EM
34	β-cariofileno	1418	1430	1888	10,9	15,80	5,30	CG-EM
35	β -farneseno	1458	1460	nd	5,56	4,90	1,94	CG-EM,Co
36	aloaromadendreno	1461	1477	nd	0,18	1,00	0,60	CG-EM,Co
37	germacreno-D	1480	1488	nd	9,21	6,00	3,30	CG-EM,Co
38	biciclogermacreno	1494	1496	1718	6,37	0,20	4,20	CG-EM
39	β -bisaboleno	1508	1509	nd	1,85	4,85	1,30	CG-EM
Sesquiterpenos oxigenados					28,46	31,08	46,92	

40	nerolidol-<i>E</i>	1564	1560	nd	16,91	21,00	30,50	CG-EM,Co
41	espatulenol	1576	1584	2110	3,30	5,00	6,70	CG-EM,Co
42	óxido de cariofileno	1581	1580	1954	2,41	2,00	2,40	CG-EM
43	τ -cadinol	1640	1646	nd	1,14	1,20	1,40	CG-EM
44	τ -muurulol	1641	1649	nd	3,40	0,40	0,22	CG-EM
45	α -cadinol	1653	1655	nd	1,30	1,48	5,70	CG-EM,Co
TOTAL					97,91	93,62	95,56	

^a Componentes listados em ordem de eluição na coluna SE-54; ^b Índice de Kovats da literatura; ^c Índice de Kovats na coluna SE-54; ^d Índice de Kovats na coluna PEG-20M; **nd**: não determinado; **Co**: co-injeção com padrões autênticos. **A**= coleta realizada na primavera (PT-3); **B**= coleta realizada no verão (PT-1); **C**= coleta realizada no outono (PT-2).

Os sesquiterpenos representaram a maioria dos componentes dos óleos analisados (65-67%), sendo estes principalmente sesquiterpenos oxigenados (28-47%). Um constituinte majoritário em concentrações de 16,9 a 30%, foi observado sendo então, identificado por espectrometria de massas e co-injeção com padrão.

Determinação estrutural

Submetido a CG-EM, o componente majoritário apresentou íon molecular $[M]^+$ com m/z de 222 (2%), além de fragmentos de m/z 161 (26%), 136 (30%), 107 (53%), 93 (83%), 69 (100%) e 41 (70%) (Figura 36), e comparando o IK obtido com dados da literatura, a fórmula molecular $C_{15}H_{26}O$ foi sugerida para este componente, sendo identificado como o sesquiterpeno nerolidol-*E* (**40**).

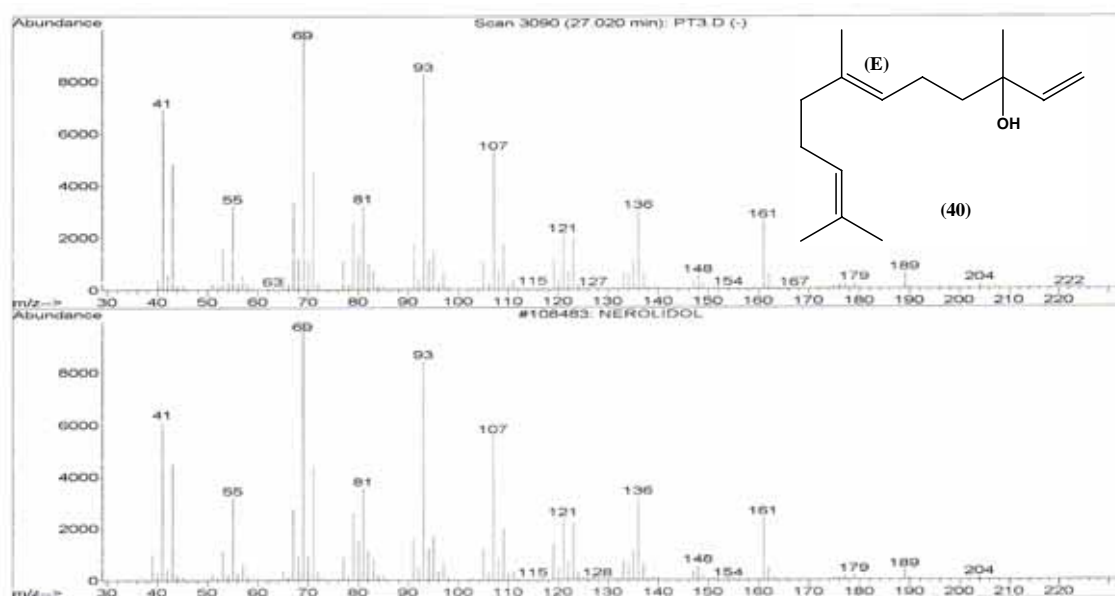


Figura 29. Espectro de massas do nerolidol encontrado no óleo de talos e folhas de *P. tetraphylla*.

Os seguintes constituintes de maior concentração são os sesquiterpenos β -cariofileno (**34**) e germacreno-D (**37**), com concentrações de 5,3-15,8% e 3,3-9,2%, respectivamente. Os demais sesquiterpenos hidrocarbonetos e oxigenados, constituem cerca de 10 e 40% do óleo, respectivamente, como pode ser observado nas Figuras 30, 31 e 32 onde os constituintes estão identificados com a numeração da Tabela 8.

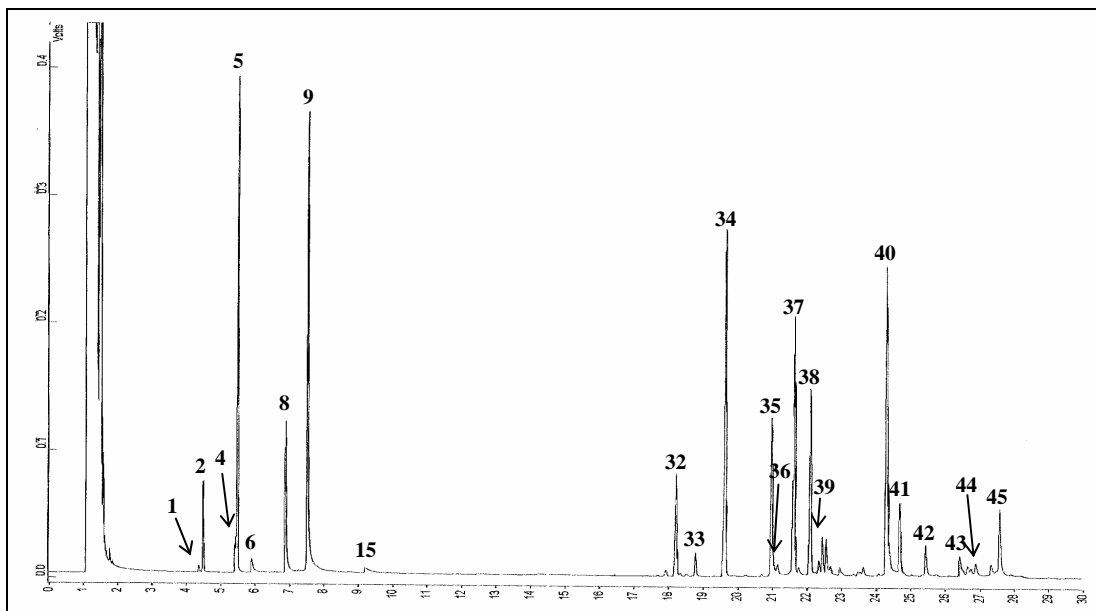


Figura 30. Perfil cromatográfico do óleo volátil de talos e folhas de *P. tetraphylla* coletados na primavera (A). Utilizando coluna SE-54, CCSF de 25 m x 0,25 mm. Programa de análise: $T_{\text{inicial}} = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{final}} = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$, rampa de $4\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

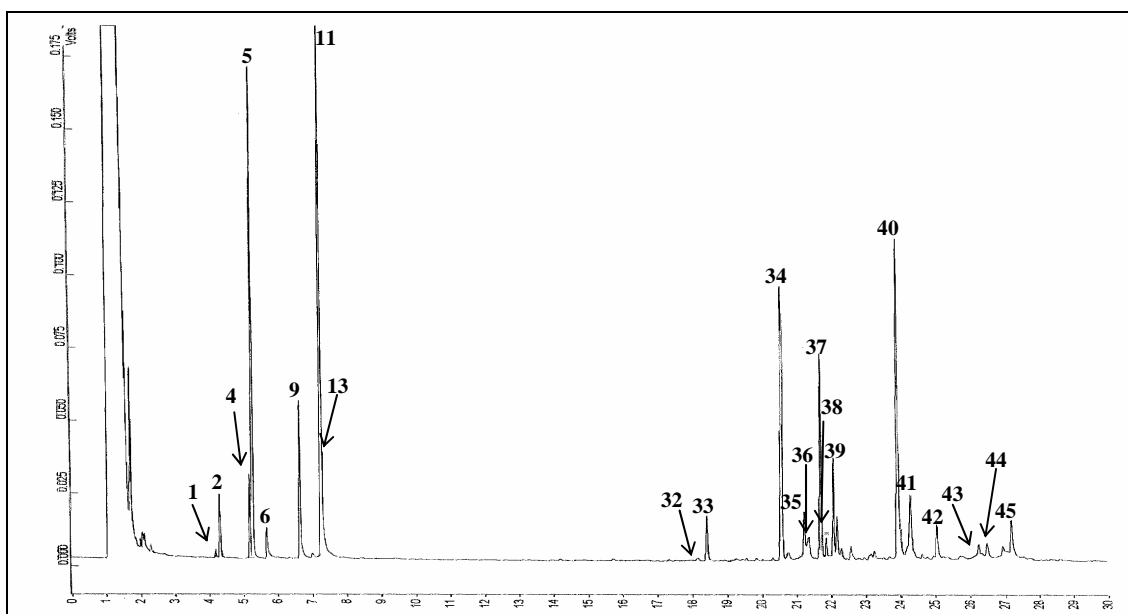


Figura 31. Perfil cromatográfico do óleo volátil de talos e folhas de *P. tetraphylla* coletados no verão (B). Utilizando coluna SE-54, CCSF de 25 m x 0,25 mm. Programa de análise: $T_{\text{inicial}} = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{final}} = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$, rampa de $4\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

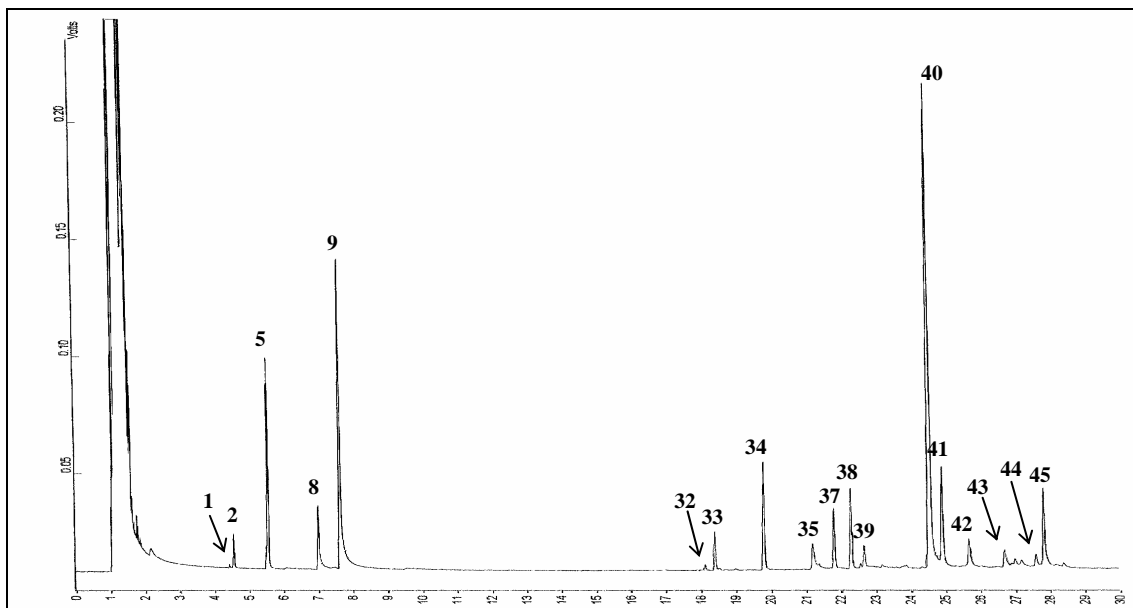


Figura 32. Perfil cromatográfico do óleo volátil de talos e folhas de *P. tetraphylla* coletados no outono (C). Utilizando coluna SE-54, CCSF de 25 m x 0,25 mm. Programa de análise: $T_{\text{inicial}} = 50$ °C, $T_{\text{final}} = 250$ °C, rampa de 4 °C min^{-1} .

A composição monoterpênica destas amostras é caracterizada pela presença do limoneno (**9**) em concentrações de 4 a 17%, seguido do β -pineno (**5**), nas concentrações de 5,3 a 9,3% e do *trans*- β -ocimeno (**11**) (4,28-10,4%) e demais monoterpenos que constituem 30% da composição total das amostras. O terpeno carvona e seus derivados, constituintes característicos da espécie *P. latifolia* também foram identificados, porém em pequenas concentrações. (Tabela 8, Figura 30, 31 e 32).

A análise sazonal revelou que o perfil do óleo volátil é modificado significativamente no outono, onde se observou uma maior concentração de nerolidol-E (**40**) e limoneno(**9**) e a ausência de muitos monoterpenos minoritários (Figura 33).

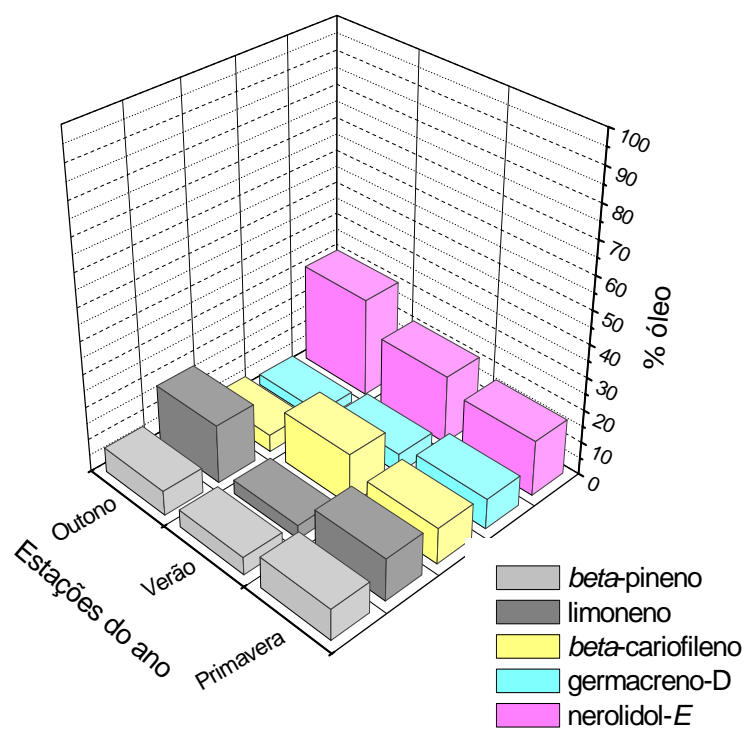


Figura 33. Representação gráfica da variação sazonal dos principais constituintes do óleo das folhas de *P. tetraphylla*.

5.4 Determinação da composição enantiomérica de terpenos presentes nos óleos voláteis de *P. latifolia*

Com o intuito de caracterizar o perfil dos óleos voláteis da espécie *Poirertia latifolia* utilizou-se a cromatografia gasosa enantiosseletiva (CGE) como ferramenta para avaliar e estabelecer a composição enantiomérica de alguns terpenos quirais, presentes nestes óleos e ainda, verificar possíveis modificações enantioméricas entre os óleos extraídos em diferentes estações do ano e também de espécies de diferentes procedências. Foram realizadas análises enantioméricas dos monoterpenos α -pineno, limoneno e carvona, em coluna capilar usando ciclodextrina modificada como fase estacionária quiral, desenvolvidas no próprio NPPN, possibilitando assim, avaliar o desempenho de novas colunas quirais frente a amostras reais.

Inicialmente, os terpenos quirais presentes nos óleos voláteis de *P. latifolia* foram selecionados de acordo com a disponibilidade de padrões racêmicos, sendo escolhidos os referentes terpenos: carvona, limoneno, α -pineno, tujeno, linalol, terpinen-4-ol, citronelal, 1-octen-3-ol, β -pineno. Realizando-se então, os testes de separação quiral destes padrões na coluna capilar contendo a fase estacionária quiral, **AM- β -CD** a qual ainda se encontra em período de testes¹⁵⁷. Os testes realizados demonstraram que a coluna **AM- β -CD** proporcionou uma ótima separação para os terpenos α -pineno, limoneno e carvona, sendo assim, utilizada para analisar a composição enantiomérica destes terpenos. Os resultados e as condições de cada injeção estão ilustrados nos respectivos cromatogramas.

A coluna foi otimizada para a separação das misturas de (+/-)- α -pineno, (+/-)-limoneno e (+/-)-carvona, determinando-se também a ordem de eluição dos respectivos enantiômeros (Figura 34, 35 e 36).

¹⁵⁷ Mallmann, A. S. Síntese e aplicação de β -ciclodextrinas modificadas como fases estacionárias quirais em cromatografia gasosa capilar enantiosseletiva. *Tese de Doutorado*, **em andamento**, UFSM, Santa Maria, RS.

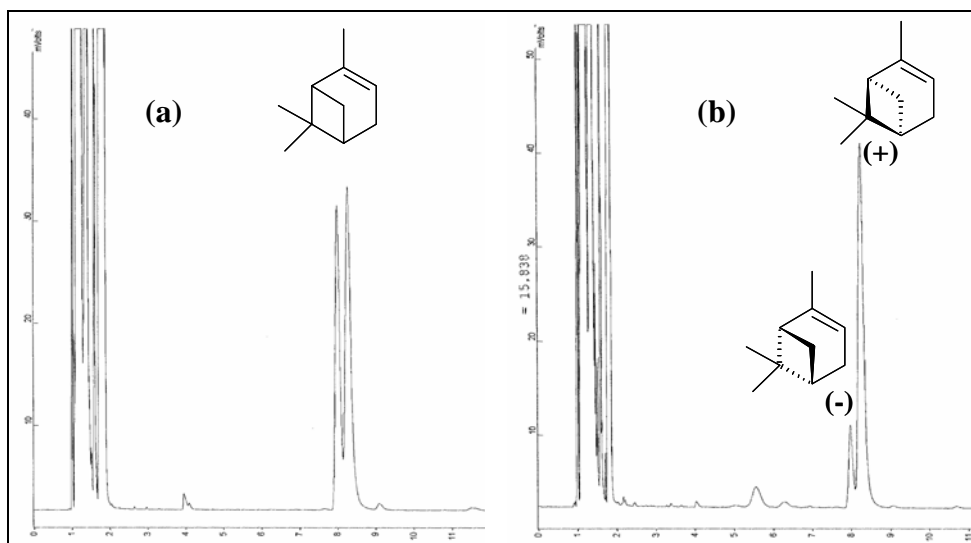


Figura 34. (a) Separação enantiomérica do (+/-)- α -pineno (2) e (b) determinação da ordem de eluição com co-injeção de (+)- α -pineno, em CCSF de 25 m x 0,25 mm recoberta com AM- β -CD/OV 1701 (1:1). 7 psi H₂, T_{inicial} = 35 °C e T_{final} = 170 °C, rampa de aquecimento de 1 °C min⁻¹.

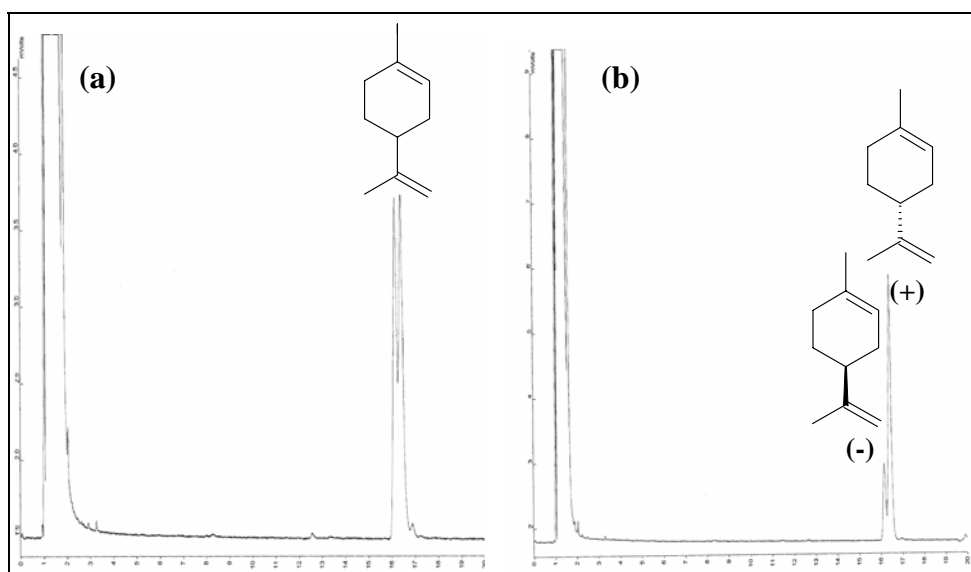


Figura 35. (a) Separação enantiomérica do (+/-)-limoneno (9) e (b) determinação da ordem de eluição com co-injeção de (+)-limoneno em CCSF de 25 m x 0,25 mm recoberta com AM- β -CD/OV 1701 (1:1). 7 psi H₂, T_{inicial} = 35 °C e T_{final} = 170 °C, rampa de aquecimento de 1 °C min⁻¹.

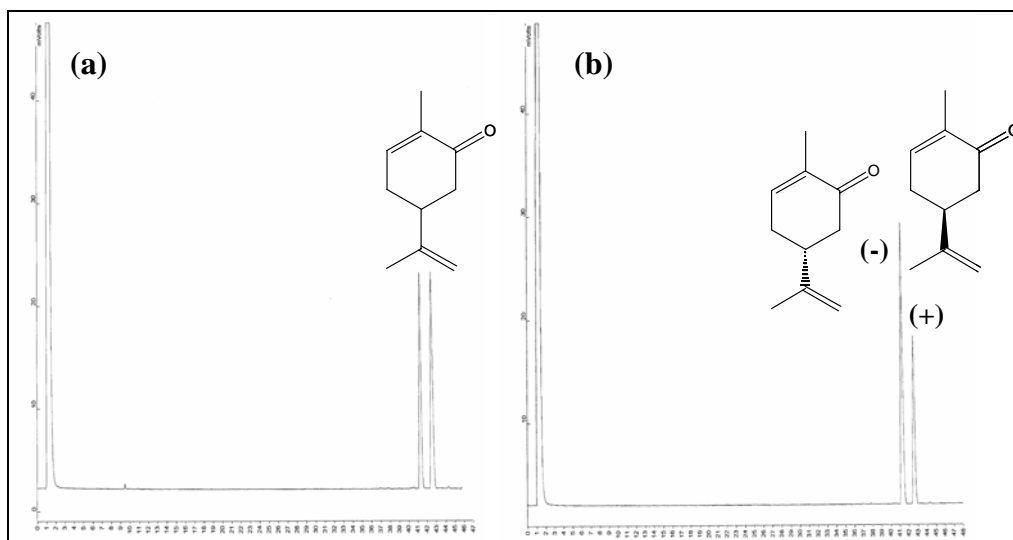


Figura 36. (a) Separação enantiomérica do (+/-)-carvona (31) e (b) determinação da ordem de eluição com co-injeção de (-)-carvona, em CCSF de 25 m x 0,25 mm recoberta com AM- β -CD /OV 1701 (1:1). 7 psi H₂, T_{inicial}= 50 °C e T_{final} = 170 °C, rampa de aquecimento de 1 °C min⁻¹.

Possuindo a ordem de eluição destes enantiômeros otimizou-se uma mistura destes padrões para realizar co-injeções com as amostras de óleo volátil a serem analisadas (Figura 37). Os terpenos β -pineno (**5**) e (+)-*trans*-dihidrocarvona (**28**) foram adicionados à mistura apenas para auxiliar na visualização do comportamento dos óleos voláteis durante a análise.

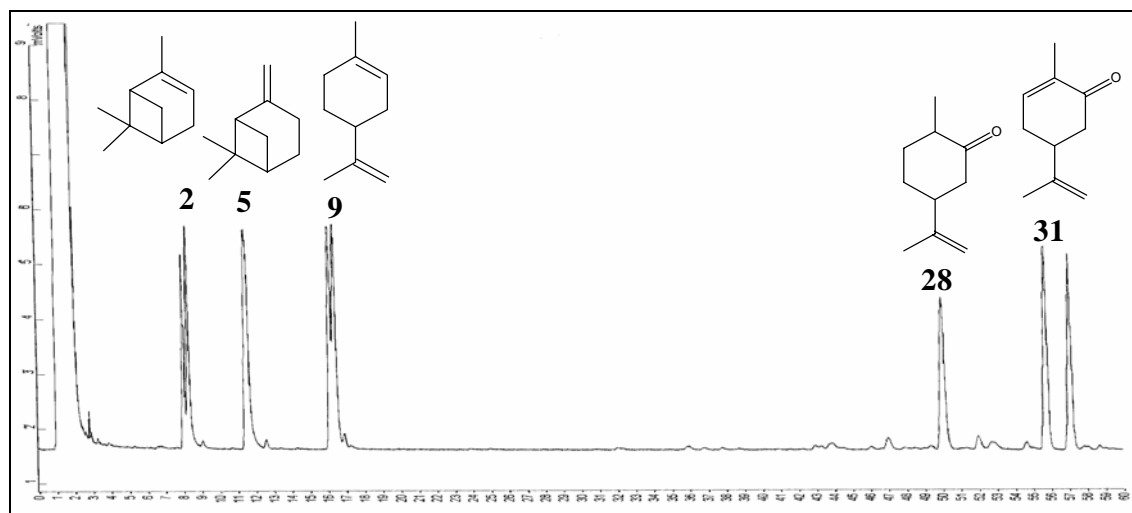


Figura 42. Separação enantiomérica da mistura de padrões racêmicos: de (+/-)- α -pineno, (+/-)-limoneno e (+/-)-carvona, em CCSF de 25 m recoberta com AM- β -CD /OV 1701 (1:1). 7 psi H₂, T_{inicial}= 35 °C e T_{final} = 170 °C, rampa de aquecimento de 1 °C min⁻¹.

Posteriormente, realizou-se a verificação da composição enantiomérica dos terpenos nos óleos voláteis de folhas e flores *P. latifolia* nativa e cultivada, utilizando os óleos que representam a análise sazonal das espécies.

5.4.1 Determinação enantiomérica de terpenos no óleo volátil de *P. latifolia* nativa

A determinação enantiomérica foi realizada com as mesmas amostras de óleo utilizadas para a análise sazonal da espécie, sendo que devido aos resultados bastante semelhantes, alguns dos cromatogramas foram omitidos. Para ilustração estão demonstrados as separações quirais dos óleos das folhas coletados na primavera (amostra **A**) (Figura 37 e 38), coletados no verão (amostra **B**) (Figura 39 e 40) e das flores coletadas em 2002 (amostra **B**) (Figura 41 e 42).

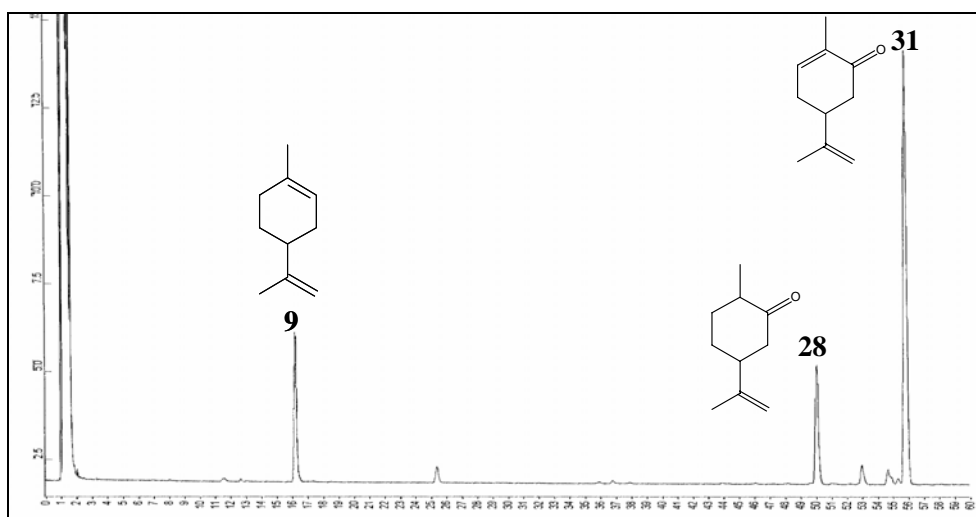


Figura 37. Cromatograma do óleo volátil das folhas de *P. latifolia* nativa, coletadas na primavera (A), em CCSF de 25 m x 0,25 mm recoberta com AM- β -CD/OV 1701(1:1). 7 psi H₂, T_{inicial} = 35 °C e T_{final} = 170 °C, rampa de aquecimento de 1 °C min⁻¹.

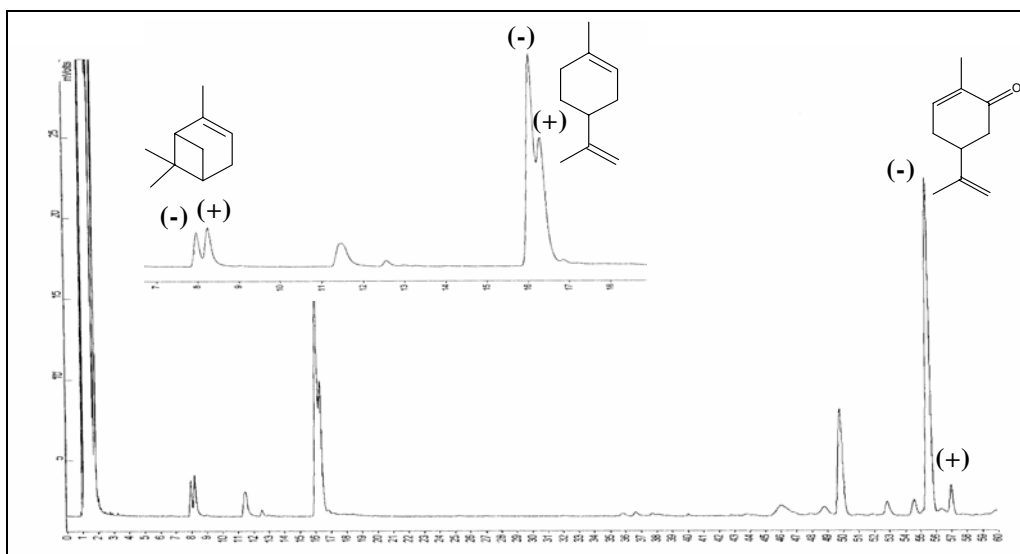


Figura 38. Identificação enantiomérica dos componentes do óleo volátil das folhas de *P. latifolia* nativa (A), com co-injeção da mistura racêmica dos padrões de terpenos, em CCSF de 25 m recoberta com AM- β -CD/OV 1701(1:1). 7 psi H₂, T_{inicial} = 35 °C e T_{final} = 170 °C, rampa de aquecimento de 1 °C min⁻¹.

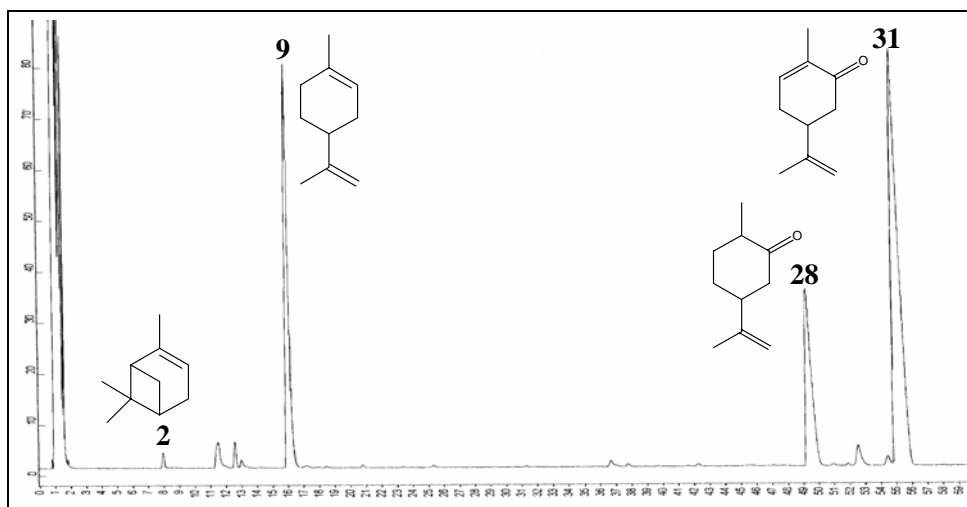


Figura 39. Cromatograma do óleo volátil das folhas de *P. latifolia* nativa, coletadas no verão (B), em CCSF de 25 m recoberta com AM- β -CD /OV 1701(1:1). 7 psi H₂, T_{inicial} = 35 °C e T_{final} = 170 °C, rampa de aquecimento de 1 °C min⁻¹.

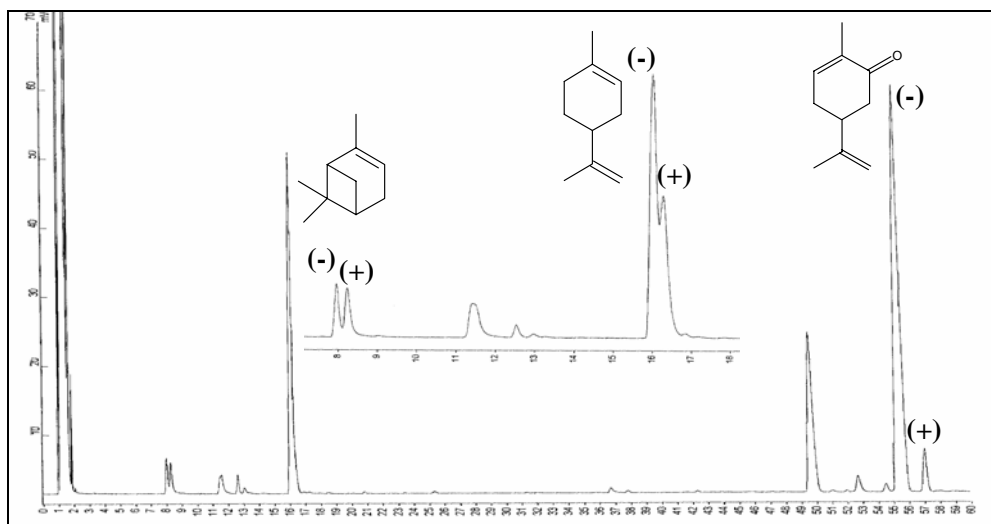


Figura 40. Identificação enantiomérica dos componentes do óleo volátil das folhas de *P. latifolia* nativa (B), com co-injeção da mistura racêmica dos padrões de terpenos, em CCSF de 25 m x 0,25 mm recoberta com AM- β -CD/OV 1701 (1:1). 7 psi H₂, T_{inicial} = 35 °C e T_{final} = 170 °C, rampa de aquecimento de 1 °C min⁻¹.

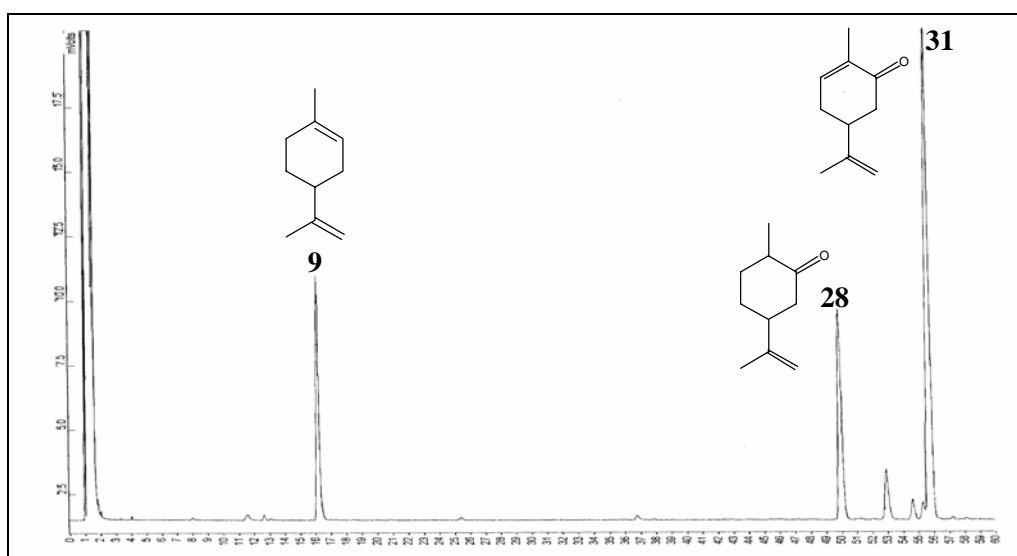


Figura 41. Cromatograma do óleo volátil das flores de *P. latifolia* nativa, coletadas em 2002 (B), em CCSF de 25 m x 0,25 mm recoberta com AM- β -CD /OV 1701 (1:1). 7 psi H₂, T_{inicial} = 35 °C e T_{final} = 170 °C, rampa de aquecimento de 1 °C min⁻¹.

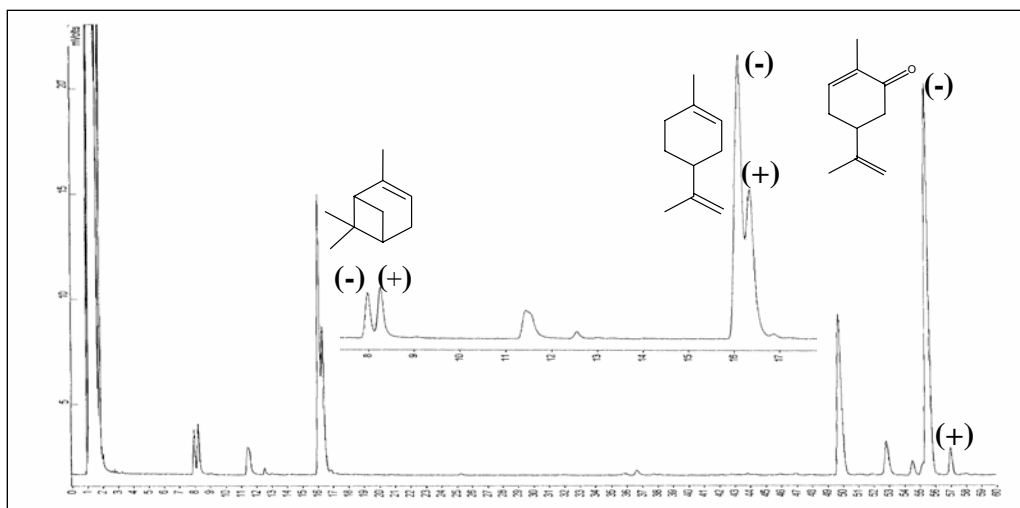


Figura 42. Identificação enantiomérica dos componentes do óleo volátil das flores *P. latifolia* nativa (B), com co-injeção da mistura racêmica dos padrões de terpenos, em CCSF de 25 m x 0,25 mm recoberta com AM- β -CD/OV 1701(1:1). 7 psi H₂, T_{inicial} = 35 °C e T_{final} = 170 °C, rampa de aquecimento de 1 °C min⁻¹.

Não foi possível determinar de forma consistente a constituição enantiomérica do terpeno α -pineno em todas as amostras, devido à sua baixa concentração em relação aos demais constituintes dos óleos, sendo levado em conta os resultados obtidos nas amostras onde este terpeno se encontra em maior concentração. A análise do óleo volátil de *Poiretia latifolia* nativa, revelou que os terpenos analisados encontram-se na forma de um único enantiômero sendo estes (-)- α -pineno, (-)-limoneno e (-)-carvona, com excessos enantioméricos > 99%.

4.4.2 Determinação enantiomérica de terpenos no óleo volátil de *P. latifolia* cultivada

A determinação enantiomérica foi realizada da mesma forma que com a espécie nativa, com as amostras de óleo utilizadas para a análise sazonal da espécie, sendo os resultados também semelhantes, somente algumas separações enantioméricas estão demonstradas, sendo elas: dos óleos das folhas coletados após o transplante (amostra **A**) (Figura 43 e 44), coletados no verão (amostra **C**) (Figura 45 e 46) e das flores coletadas em 2003 (amostra **A**) (Figura 47 e 48). Nesta espécie foi muito difícil realizar a análise enantiomérica do terpeno α -pineno, não se obtendo resultados confiáveis.

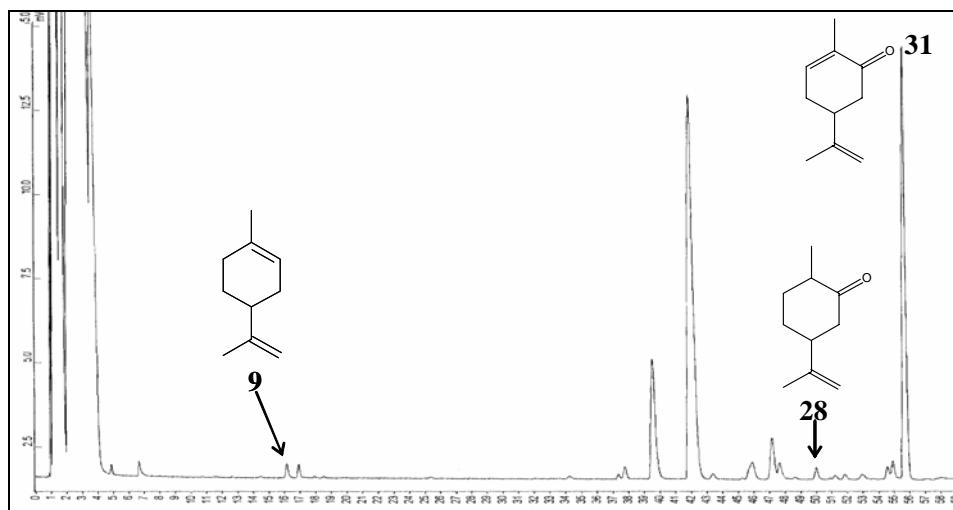


Figura 43. Cromatograma do óleo volátil das folhas de *P. latifolia* cultivada, coletadas logo após o transplante (A), em CCSF de 25 m x 0,25 mm recoberta com AM- β -CD/OV 1701 (1:1). 7 psi H₂, T_{inicial} = 35 °C e T_{final} = 170 °C, rampa de aquecimento de 1 °C min⁻¹.

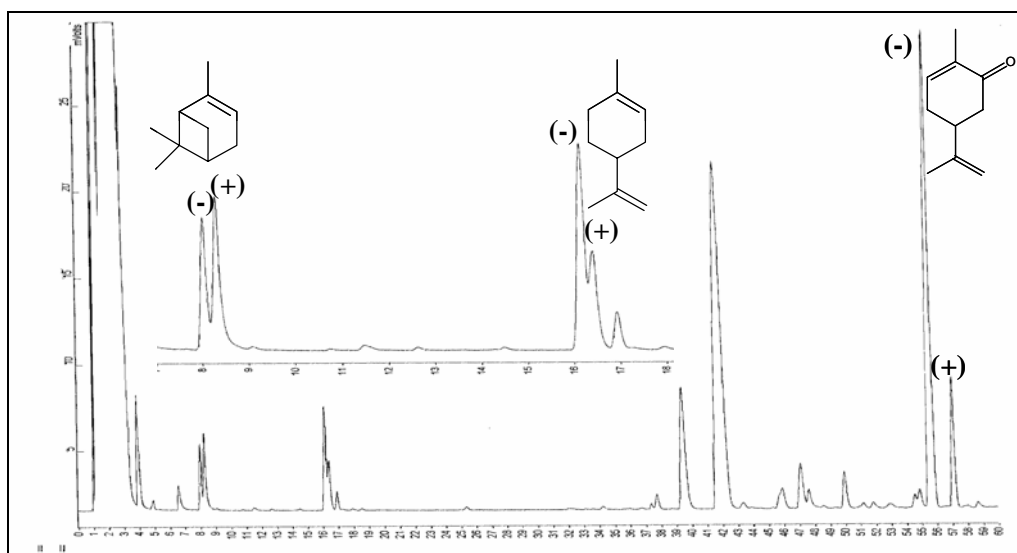


Figura 44. Identificação enantiomérica dos componentes do óleo volátil das folhas *P. latifolia* cultivada (A), com co-injeção da mistura racêmica dos padrões de terpenos, em CCSF de 25 m x 0,25 mm recoberta com AM- β -CD/OV 1701 (1:1). 7 psi H₂, T_{inicial} = 35 °C e T_{final} = 170 °C, rampa de aquecimento de 1 °C min⁻¹.

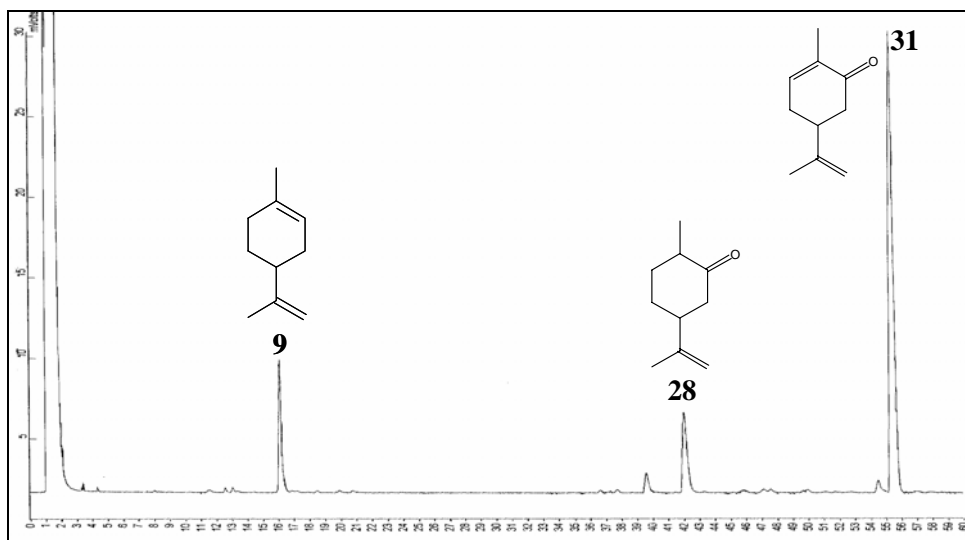


Figura 45. Cromatograma do óleo volátil das folhas de *P. latifolia* cultivada, coletadas no verão (C), em CCSF de 25 m x 0,25 mm recoberta com AM- β -CD/OV 1701 (1:1). 7 psi H₂, T_{inicial} = 35 °C e T_{final} = 170 °C, rampa de aquecimento de 1 °C min⁻¹.

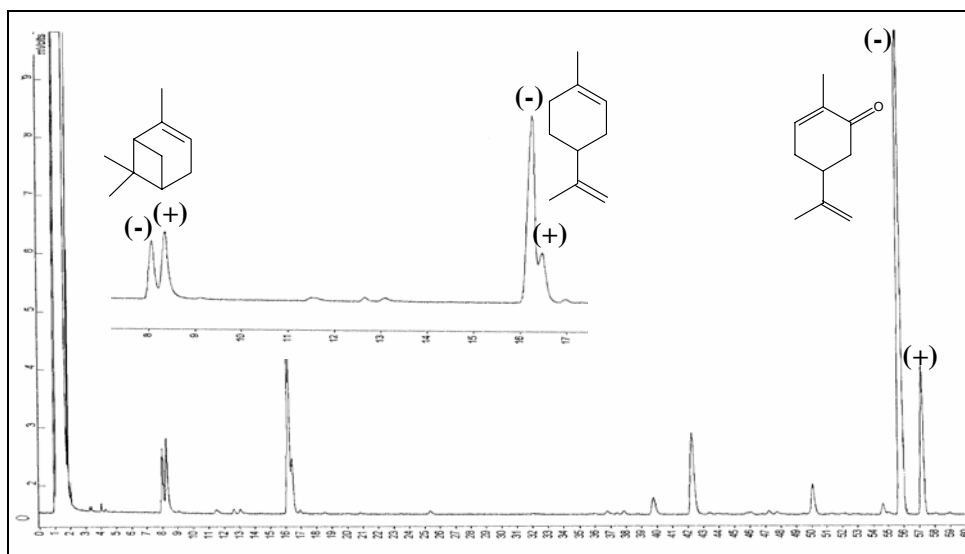


Figura 46. Identificação enantiomérica dos componentes do óleo volátil das flores *P. latifolia* cultivada (C), com co-injeção da mistura racêmica dos padrões de terpenos, em CCSF de 25 m x 0,25 mm recoberta com AM- β -CD/OV 1701 (1:1). 7 psi H₂, T_{inicial} = 35 °C e T_{final} = 170 °C, rampa de aquecimento de 1 °C min⁻¹.

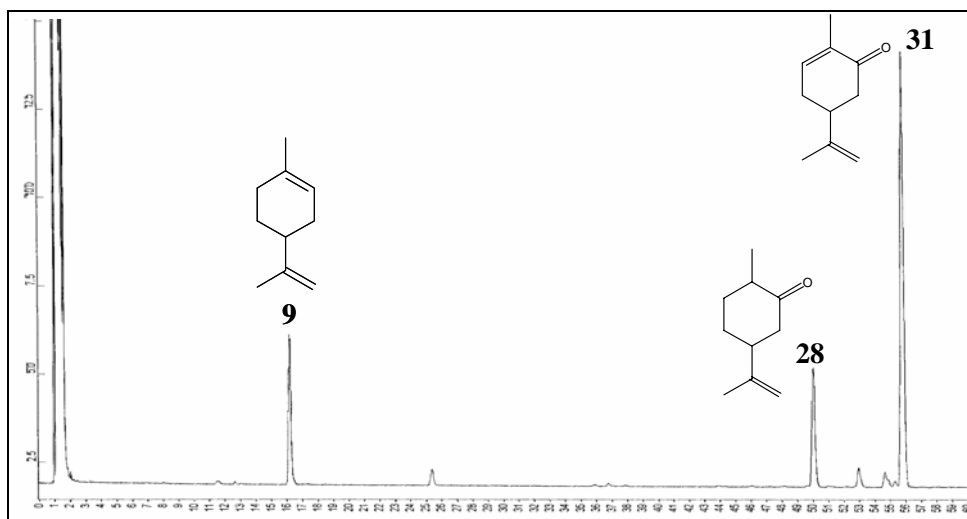


Figura 47. Cromatograma do óleo volátil das flores de *P. latifolia* cultivada, coletadas realizada em 2003 (A), em CCSF de 25 m x 0,25 mm recoberta com AM- β -CD/OV 1701 (1:1). 7 psi H₂, T_{inicial} = 35 °C e T_{final} = 170 °C, rampa de aquecimento de 1 °C min⁻¹.

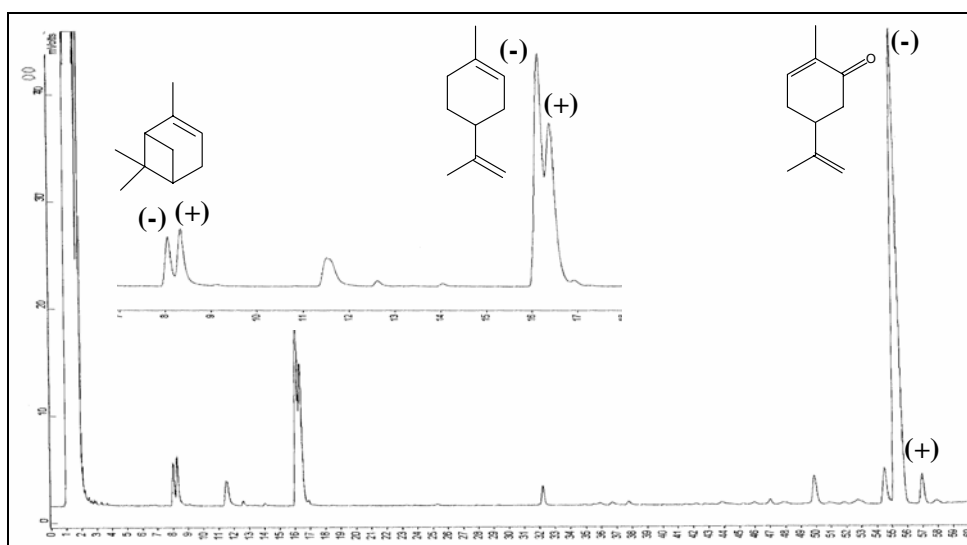


Figura 48. Identificação enantiomérica dos componentes do óleo volátil das flores *P. latifolia* cultivada (A), com co-injeção da mistura racêmica dos padrões de terpenos, em CCSF de 25 m x 0,25 mm recoberta com AM- β -CD/OV 1701 (1:1). 7 psi H₂, T_{inicial} = 35 °C e T_{final} = 170 °C, rampa de aquecimento de 1 °C min⁻¹.

A análise do óleo volátil de *Poiretia latifolia* cultivada, revelou que os terpenos encontram-se na forma de um único enantiômero sendo estes o *S*-(-)-limoneno e a *R*-(-)-carvona, com excessos enantioméricos > 99%, resultado idêntico ao a espécie de *P. latifolia* nativa.

Os resultados da determinação enantiomérica de *P. latifolia* demonstraram que apesar das diferenças na constituição química total do óleo volátil entre as espécies de diferentes locais, a constituição enantiomérica dos constituintes majoritários permanece a mesma, mesmo durante o desenvolvimento do vegetal, o que pode ser comprovado pela avaliação das amostras sazonais destas espécies.

Estas informações também demonstraram a espécie *P. latifolia* provavelmente utilize a mesma rota biossintética da *Mentha spicata*, demonstrada por Gershenzon e Croteau (1989)⁹³, para a obtenção dos seus metabólitos secundários, já que o (-)- α -pineno é o precursor do (-)-limoneno que se oxida levando a formação da (-)-carvona⁶⁹.

De qualquer forma, pode-se afirmar que a espécie *P. latifolia* deve ser considerada uma nova fonte de carvona, principalmente por apresentar apenas o enantiômero de configuração (*R*), em altas concentrações. Uma das poucas espécies exploradas comercialmente como fonte de *R*-(-)-carvona é a *Mentha spicata* que, de acordo com a literatura, muitas vezes produz uma mistura de isômeros⁹⁰. Estes resultados são bastante significativos já que este terpeno é muito utilizado na indústria alimentícia e de cosméticos e como intermediários quirais em síntese assimétrica e na síntese de alguns agentes antivirais⁹¹.

VI. ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA PRELIMINAR DE *POIRETIA LATIFOLIA* BRIQ. E *POIRETIA TETRAPHYLLA* VOG.

Diversas metodologias de análise estão disponíveis para auxiliar na busca de compostos biologicamente ativos, dentre muitos métodos alguns são de fácil manuseio, rápidos, com um custo relativamente barato e não requerem muitos equipamentos especiais. Com isso, o NPPN mantém um laboratório de atividades biológicas onde são desenvolvidas algumas técnicas para a avaliação preliminar do potencial antimicrobiano, antioxidante e citotóxico de substâncias naturais isoladas e misturas complexas. Tais técnicas foram aplicadas a amostras de *Poiretia latifolia* e *tetraphylla* de forma a avaliar os seus metabólitos ativos.

6.1. Determinação da atividade antimicrobiana “in vitro”.

6.1.1. Determinação da Atividade Antimicrobiana pelo Método de Bioautografia.

Os ensaios de determinação de atividade antimicrobiana pelo método de Bioautografia foram realizados de acordo com Hamburguer e Hostettmann^{137, 136}. As amostras selecionadas para a bioautografia foram: o óleo volátil das folhas de *Poiretia latifolia* nativa, coletadas na primavera; os monoterpenos *R*-(-)- e *S*-(+)-carvona separadamente; o óleo volátil das folhas de *Poiretia latifolia* cultivada, coletadas na primavera; e o óleo volátil das folhas de *Poiretia tetraphylla*, coletadas na primavera.

Além das amostras de óleos voláteis e terpenos, o ensaio também foi utilizado para avaliar um extrato etanólico obtido das raízes de *P. latifolia* nativa, o qual após o fracionamento originou três frações consideradas interessantes: fração hexânica (**FH**), fração clorofórmica (**FC**) e fração acetato de etila (**FA**).

Todas as amostras foram aplicadas em cromatoplacas, juntamente com um padrão adequado e, submetidas ao ensaio. As Tabelas 9 e 10 ilustram os resultados médios obtidos nos testes realizados em triplicata.

Tabela 9. Determinação da quantidade inibitória mínima dos óleos voláteis e monoterpenos de *P. latifolia* e *P. tetraphylla*.

Microrganismo ^a	PL	PH	R-carv	S-carv	PT	Padrão ^a
<i>S. aureus</i>	25,0 µg	25 µg	NA	NA	NA	0,7 µg
<i>S. epidermidis</i>	50,0 µg	50 µg	NA	150 µg	NA	0,7 µg
<i>B. subtilis</i>	100,0 µg	100 µg	200 µg	150 µg	NA	0,7 µg
<i>E.coli</i>	100,0 µg	100 µg	200 µg	200 µg	NA	0,5 µg
<i>S.setubal</i>	150,0 µg	150 µg	NA	NA	NA	0,7 µg
<i>K. pneumoniae</i>	50,0 µg	50 µg	NA	150 µg	NA	0,4 µg
<i>P. aeruginosa</i>	100,0 µg	100 µg	200 µg	150 µg	NA	0,7 µg
<i>C. albicans</i>	12,5 µg	25,0 µg	12,5 µg	12,5 µg	NA	2,0 µg
<i>S. cerevisiae</i>	12,5 µg	25,0 µg	12,5 µg	12,5 µg	NA	2,5 µg
<i>C. dublinensis</i>	50,0 µg	100 µg	NA	NA	NA	2,5 µg
<i>C. neoformans</i>	50,0 µg	100 µg	NA	NA	NA	2,5 µg

^a Cloranfenicol para bactérias e nistatina para fungos; **NA:** Não Ativo;

PL: *Poiretia latifolia* nativa; **PH:** *Poiretia latifolia* cultivada; **PT:** *Poiretia tetraphylla*; **R-carv:** isômero R da carvona e **S-carv:** isômero S da carvona.

De acordo com os dados da Tabela 9, os óleos voláteis de *P. latifolia* nativa (**PL**) e cultivada (**PH**) mostraram baixa ou nenhuma atividade frente à maioria dos microorganismos testados. A inibição mais expressiva ocorreu frente aos fungos *C. albicans* e *S. cerevisiae* (12,5 µg). Comparando-se com o padrão de nistatina (2,5 µg), e levando em conta que se trata de misturas de substâncias e não de amostras puras, pode-se considerar que as amostras de *Poiretia latifolia* foram bem ativas contra estes fungos.

Os monoterpenos R(-)- e S(+)-carvona mostraram um comportamento semelhante aos óleos voláteis de *P. latifolia* nativa e cultivada, com pouca atividade contra as bactérias e uma inibição dos fungos *C. albicans* e *S. cerevisiae* (Figura 49) equivalente àquela observada nos óleos voláteis, ricos no terpeno R-carvona. Este fato pode indicar que este constituinte pode ser o principal responsável pela ação inibitória de fungos e ainda, demonstra que os dois enantiômeros apresentaram atividade antimicrobiana semelhante, como já observado por Verstegen e col.⁸⁷.

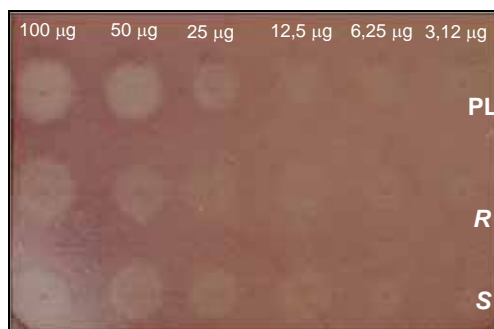


Figura 49. Teste de bioautografia do óleo volátil de *P. latifolia* nativa (PL), *R*-carvona e *S*-carvona frente ao fungo *Candida albicans*.

Já a amostra de óleo volátil de *Poiretia tetraphylla* (PT), não apresentou nenhum tipo de inibição microbiana, este fato deve estar ligado à constituição deste óleo, rico em sesquiterpenos, os quais segundo a literatura, não possuem características antimicrobianas tão expressivas quanto a apresentada pelos monoterpenos^{34,36,82}.

Conforme a Tabela 10 e a Figura 50, as três frações do extrato etanólico das raízes de *P. latifolia* nativa, fração hexânica (FH), fração clorofórmica (FC) e fração acetato de etila (FA), foram moderadamente ativas contra as bactérias testadas, sendo que a FH teve a melhor atividade, com concentrações inibitórias de 50 µg para todos os microorganismos, seguida da FA que mostrou o mesmo perfil antibacteriano, exceto para a cepa *Staphylococcus aureus*, concentração inibitória mínima de 200 µg. A fração FC demonstrou atividade considerável apenas para as bactérias *S. epidermidis*, *B. subtilis*, e *E. coli*, inibindo-as também na concentração de 50 µg. Porém, frente aos fungos, as frações do extrato demonstraram uma alta atividade para as cepas *C. albicans* e *S. cerevisiae* com concentração inibitória de 12,5 µg e apenas a FH teve uma atividade moderada contra os fungos *C. dublinensis* e *C. neoformans* (100 µg).

Tabela 10. Determinação da quantidade inibitória mínima das frações do extrato etanólico das raízes de *Poiretia latifolia* nativa.

Microrganismos	FH	FC	FA	Padrão ^a
<i>S. aureus</i>	50 µg	200 µg	200 µg	0,7 µg
<i>S. epidermidis</i>	50 µg	50 µg	50 µg	0,7 µg
<i>B. subtilis</i>	50 µg	50 µg	50 µg	0,7 µg
<i>E.coli</i>	50 µg	50 µg	50 µg	0,5 µg
<i>S.setubal</i>	50 µg	200 µg	50 µg	0,7 µg
<i>K. pneumoniae</i>	50 µg	200 µg	50 µg	0,4 µg
<i>P. aeruginosa</i>	50 µg	200 µg	50 µg	0,7 µg
<i>C. albicans</i>	12,5 µg	12,5 µg	12,5 µg	2,0 µg
<i>S. cerevisiae</i>	12,5 µg	12,5 µg	12,5 µg	2,5 µg
<i>C. dublinensis</i>	100 µg	NA	NA	2,5 µg
<i>C. neoformans</i>	100 µg	NA	NA	2,5 µg

^a Cloranfenicol para bactérias e nistatina para fungos; **NA:** Não Ativo; **FH:** Fração hexânica; **FC:** Fração clorofórmica; **FA:** Fração acetato de etila.

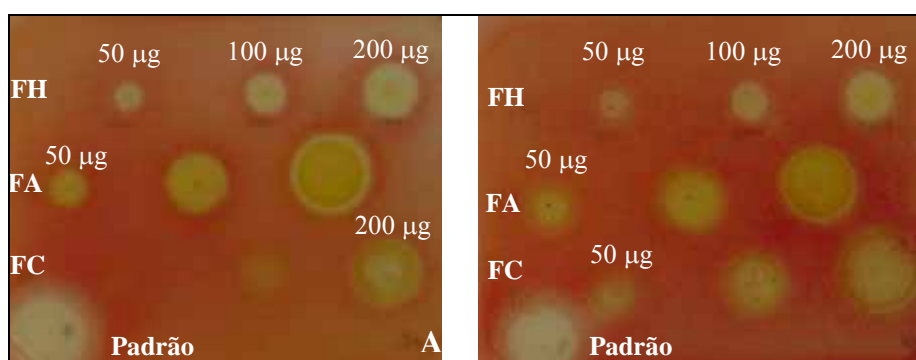


Figura 50. Ensaios de Bioautografia realizados com as frações do extrato etanólico da raiz de *Poiretia latifolia* nativa, (A) frente à bactéria *S.setubal*; (B) frente à bactéria *K. pneumoniae*. **FH:** fração hexânica; **FC:** fração clorofórmica; **FA:** fração acetato.

6.1.2. Determinação da CIM pelo Método de Microdiluição.

Para realização de ensaios de CIM (Concentração Inibitória Mínima) foram selecionadas amostras do óleo volátil das folhas de *Poiretia latifolia* nativa, coletada na primavera (**PL**), *Poiretia latifolia* cultivada (**PH**), *Poiretia tetraphylla*, coletada na primavera (**PT**), além de alguns monoterpenos majoritários nestes óleos: *R*- e *S*-carvona,

limoneno, dihidrocarvona e nerolidol. Foram escolhidas duas amostras de *P. latifolia* cultivada por apresentarem dois perfis de constituição diferentes: amostra **PH₁** coletada na verão (alto conteúdo de α - e β -tujona: 3,6 e 16,1%; respectivamente) e amostra **PH₂** coletada na primavera (baixo conteúdo de α - e β -tujona: 0,25 e 0,3%; respectivamente). Além da determinação do CIM, estes testes também possibilitaram determinar os valores de CBM (Concentração Bactericida Mínima) e CFM (Concentração Fungicida Mínima). As amostras foram testadas em triplicata e as médias dos resultados obtidos encontram-se listados nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11. Resultados de CIM, CBM e CFM para os óleos de *P. latifolia* e *P. tetraphylla*.

Microrg.	PL		PH ₁		PH ₂		PT		Padrão ^a
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM
<i>S. aureus</i>	2,50	>20,0	5,0	>20,0	5,0	>20,0	>20,0	-	6,25 x10 ⁻³
<i>S. epidermidis</i>	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	>20,0	-	6,25 x10 ⁻³
<i>B. subtilis</i>	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	>20,0	-	3,12 x10 ⁻³
<i>E. coli</i>	5,0	>20,0	5,0	>20,0	5,0	>20,0	>20,0	-	3,12 x10 ⁻³
<i>S. setubal</i>	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	>20,0	-	3,12 x10 ⁻³
<i>K. pneumoniae</i>	5,0	5,0	2,5	2,5	2,5	2,5	>20,0	-	3,12 x10 ⁻³
<i>P. aeruginosa</i>	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	>20,0	-	3,12 x10 ⁻³
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM
<i>C. albicans</i>	5,0	10,0	5,0	10,0	5,0	20,0	>20,0	-	10,3 x10 ⁻³
<i>S. cerevisiae</i>	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	5,0	>20,0	-	10,3 x10 ⁻³
<i>C. dubliniensis</i>	2,5	5,0	2,5	5,0	2,5	10,0	>20,0	-	10,3 x10 ⁻³
<i>C. neoformans</i>	2,5	5,0	2,5	5,0	5,0	20,0	>20,0	-	5,15 x10 ⁻³

^a Cloranfenicol para bactérias e Nistatina para fungos.

PL: óleo das folhas de *P. latifolia* nativa; **PH₁**: óleo das folhas de *P. latifolia* cultivada com alto teor de α - e β -tujona; **PH₂**: amostras de óleo das folhas de *P. latifolia* cultivada com baixo teor de α - e β -tujona; **PT:** óleo das folhas de *P. tetraphylla*.

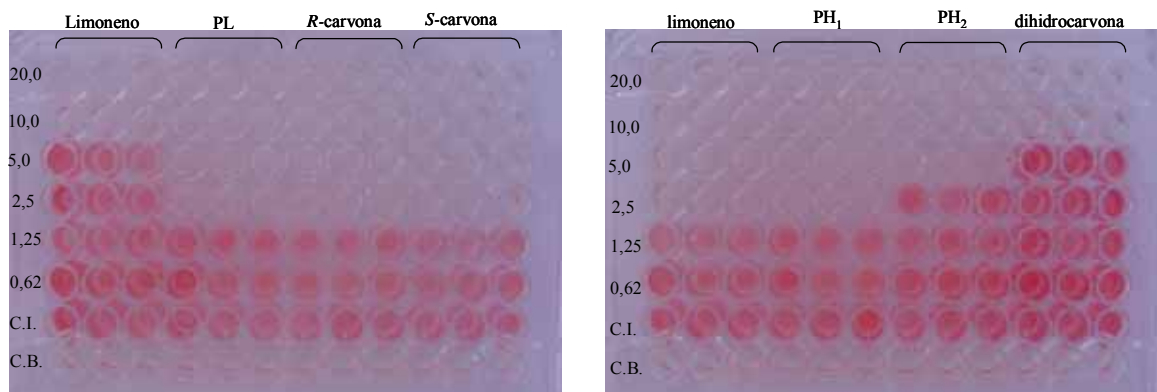


Figura 51. Placas contendo os CIMs de algumas amostras analisadas.

Concentrações de 20 a 0,62 mg mL⁻¹; C.I: controle do inóculo, CB: controle branco.

Pode-se observar que o óleo volátil das folhas de *P. latifolia* nativa (**PL**) apresentou uma atividade moderada (2,5 a 5,0 mg mL⁻¹) contra todas as bactérias testadas, tendo uma atividade mais efetiva apenas frente a bactéria *K. pneumoniae* (2,5 mg mL⁻¹), sendo que o mesmo apresentou característica bactericida, já que o valor de CIM coincide com o de CBM, frente a maioria da bactérias, exceto *S. aureus* e *E. coli* onde a CIM foi bem inferior ao CBM, sendo então bacteriostático. Já frente aos fungos, o óleo teve uma atividade bem mais expressiva com CIMs de 1,25 a 5,0 mg mL⁻¹ e o óleo foi mais efetivo contra o fungo *S. cerevisiae*, apresentando caráter fungicida (CIM=CFM= 2,5 mg mL⁻¹).

Ambas as amostras do óleo das folhas de *P. latifolia* cultivada (**PH₁** e **PH₂**) mostraram um perfil de atividade antimicrobiana semelhante entre elas e comparadas ao óleo de *P. latifolia* nativa (**PL**), sendo que elas foram moderadamente menos efetivas para os fungos *S. cerevisiae* e *C. neoformans*, com CIM de 2,5 mg mL⁻¹ e CFM de 5,0 mg mL⁻¹ e ainda, a amostra **PH₂**, contendo maior teor de β -tujona, apresentou menor atividade frente ao fungo *C. neoformans*, comparada com a amostra **PH₁**. Estes resultados são ilustrados na Figura 51 e indicam que a presença do terpenos β -tujona praticamente não acentuou a atividade antimicrobiana deste óleo.

O óleo volátil de *P. tetraphylla* (**PT**) não apresentou atividade antimicrobiana frente as bactérias e fungos testados, o que reafirma os resultados obtidos no teste de bioautografia (Tabela 9).

Ensaio de CIM de alguns de seus constituintes majoritários dos óleos voláteis estudados foram realizados paralelamente, de modo a relacionar a atividade antimicrobiana destes óleos voláteis com a de seus principais constituintes. (Tabela 13, Figura 51)

Tabela 13. Resultados de CBM, CBM e CFM para os terpenos puros, em mg mL⁻¹.

M.O.	A		B		C		D		E		Padrão ^a
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	
<i>S a</i>	5,0	>20,0	5,0	>20,0	5,0	>20,0	10,0	>20,0	NA	NA	6,25 x10 ⁻³
<i>S e</i>	5,0	5,0	5,0	5,0	10,0	>20,0	10,0	>20,0	NA	NA	6,25 x10 ⁻³
<i>B s</i>	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	>20,0	10,0	>20,0	NA	NA	3,12 x10 ⁻³
<i>E c</i>	5,0	>20,0	5,0	>20,0	5,0	>20,0	10,0	>20,0	NA	NA	3,12 x10 ⁻³
<i>K p</i>	2,5	2,5	2,5	2,5	5,0	>20,0	10,0	>20,0	NA	NA	3,12 x10 ⁻³
<i>P a</i>	5,0	5,0	5,0	5,0	20,0	>20,0	20,0	20,0	NA	NA	3,12 x10 ⁻³
<i>C a</i>	2,5	5,0	2,5	5,0	5,0	5,0	5,0	>20,0	NA	NA	10,3 x10 ⁻³
<i>S c</i>	1,25	5,0	1,25	5,0	5,0	5,0	10,0	20,0	NA	NA	10,3 x10 ⁻³
<i>C d</i>	1,25	2,5	1,25	5,0	5,0	5,0	10,0	10,0	NA	NA	10,3 x10 ⁻³
<i>C n</i>	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	20,0	10,0	10,0	NA	NA	5,15 x10 ⁻³

^a Cloranfenicol para bactérias e Nistatina para fungos.

A: *R*-carvona; **B:** *S*-carvona; **C:** limoneno; **D:** *trans*-dihidrocarvona; **E:** nerolidol-E

Observou-se que os dois isômeros da carvona mostraram o mesmo tipo de ação antimicrobiana, como já citado no teste de bioautografia. Comparando os resultados do CIM da *R*-carvona, constituinte majoritário das amostras de *P. latifolia* nativa e cultivada, com aqueles obtidos para os respectivos óleos, nota-se um comportamento muito semelhante, sendo que a *R*-carvona na forma pura mostrou-se mais ativa frente aos fungos, porém com caráter fungioestático.

Já os constituintes secundários *P. latifolia* nativa e cultivada, limoneno e dihidrocarvona, demonstraram uma atividade moderada, com CIMs de 2,5 a 20mg mL⁻¹ e um caráter basicamente inibitório. O sesquiterpeno nerolidol, um dos principais constituintes do óleo volátil de *P. tetraphylla* não demonstrou nenhum carácter inibitório contra os microorganismos testados, repetindo o comportamento do óleo volátil.

6.2. Determinação de toxicidade “*in vivo*”.

6.2.1. Teste de letalidade por *Artemia salina*

O teste é realizado submetendo-se ovos recém-eclodidos de *Artemia salina* a uma solução contendo a amostra em diversas concentrações. Após um período de 24 h observa-se o número total de larvas. Determinou-se a CL_{50} , concentração letal capaz de matar 50% da população total de animais, por métodos de regressão linear. As amostras são consideradas ativas quando $CL_{50} < 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Foram testadas as mesmas amostras de óleos voláteis selecionadas para o teste de CIM, sendo que as análises foram realizadas em triplicata, obtendo-se uma média dos resultados, conforme a Tabela 14.

Tabela 14. Concentração letal das amostras frente a *Artemia salina*.

Amostras	$LC_{50} (\mu\text{g mL}^{-1})$
<i>P. latifolia</i> nativa	67,0
<i>P. latifolia</i> cultivada	85,0
<i>R</i> -carvona	550,0
<i>S</i> -carvona	540,0
limoneno	980,0
<i>trans</i> -dihidrocarvona	> 1000
<i>P. tetraphylla</i>	428,0
sulfato de quinina	250,0
$K_2Cr_2O_7$	14,2

Assim, comparando com dados da literatura^{101,140,143}, as amostras dos óleos das folhas de *P. latifolia* nativa (**PL**) e cultivada (**PH**) apresentaram uma alta toxicidade frente *A. salina*, com CL_{50} de 67 e 85 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Os terpenos *R*- e *S*-carvona foram moderadamente ativos apresentando CL_{50} de 550 e 540 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente e o limoneno e a *trans*-dihidrocarvona foram praticamente inativos. Já o óleo das folhas de *P. tetraphylla* (**PT**) apresentou uma toxicidade mais baixa, em relação aos óleos voláteis anteriores, com CL_{50} de 428 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os padrões de toxidez utilizados foram o sulfato de quinina que é um agente citotóxico e inseticida¹⁴⁰ e dicromato de potássio, sal de metal pesado usado para monitorar o desempenho do teste¹⁰¹.

6.3 Teste de Atividade Antioxidante pelo Método do radical livre DPPH

As amostras selecionadas para este teste foram as mesmas utilizadas para a Bioautografia (6.1.1): o óleo volátil das folhas de *Poiretia latifolia* nativa, coletadas na primavera (PL); os monoterpenos *R*-(-)- e *S*-(+)-carvona separadamente; o óleo volátil das folhas de *Poiretia latifolia* cultivada, coletadas na primavera (PH); e o óleo volátil das folhas de *Poiretia tetraphylla*, coletadas na primavera (PT). O ensaio também foi utilizado para avaliar frações hexânica (FH), clorofórmica (FC) e acetato de etila (FA) do extrato etanólico das raízes de *P. latifolia* nativa, como antioxidantes padrões foram utilizados os flavonóides quercetrina e isoquercetina, sendo aplicadas juntamente com as amostras. As Figuras 52 e 53 ilustram os resultados obtidos para os óleos e frações.

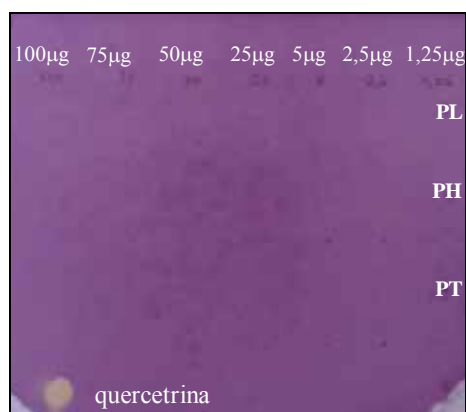


Figura 52. Resultado do teste do DPPH para os óleos voláteis.

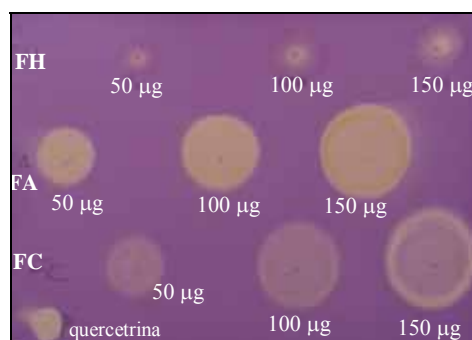


Figura 53. Resultado do teste do DPPH para as frações do extrato etanólico de *P. latifolia* nativa.

Pelas figuras anteriores pode-se verificar que todos os óleos voláteis testados e seus constituintes não foram ativos como trapeadores do radical livre DPPH, porém todas as frações do extrato etanólico de *P. latifolia* apresentaram tal atividade. A frações hexânica e clorofórmica apresentaram quantidade mínima ativa de 50 µg, enquanto que a fração acetato de etila foi a mais ativa, apresentando quantidade ativa inferior a 50 µg.

VII. CONCLUSÕES

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

As técnicas analíticas empregadas neste trabalho demonstraram alta eficiência na determinação da constituição dos óleos voláteis das espécies em estudo, sendo possível a identificação da grande maioria dos constituintes destes óleos.

O estudo dos óleos voláteis das folhas e flores de *Poiretia latifolia* demonstrou que a espécie é rica em monoterpenos, sendo o componente majoritário a carvona, seguido do limoneno e da *trans*-dihidrocarvona. Uma variação considerável na constituição dos óleos voláteis foi observada em plantas de diferentes procedências, com o aparecimento de dois novos metabólitos: a α - e β -tujona. A análise da variação sazonal revelou um comportamento relativamente estável na composição monoterpênica dos óleos, sendo que as modificações ocorrem nos teores dos constituintes majoritários.

O estudo dos óleos voláteis de talos e folhas de *Poiretia tetraphylla* revelou que, diferentemente da anterior, esta espécie é rica em sesquiterpenos, tendo como componentes majoritários o nerolidol, seguido do β -cariofileno e do germacreno-D. A análise sazonal demonstrou uma variação considerável da constituição dos óleos, principalmente pelo desaparecimento dos monoterpenos minoritários, durante o período do outono, seguido do aumento significativo do sesquiterpeno nerolidol.

O estudo da composição enantiomérica de alguns constituintes dos óleos voláteis de *Poiretia latifolia* demonstrou que os monoterpenos α -pineno, limoneno e carvona encontram-se todos na forma de um único enantiômero, sendo estes: (-)- α -pineno, *S*-(-)-limoneno e a *R*-(-)-carvona, com excessos enantioméricos > 99%, não ocorrendo nenhuma alteração em todo período de desenvolvimento da planta, nem mesmo em plantas de diferentes procedências.

Pode-se observar que a cromatografia gasosa enantiosseletiva é uma ferramenta versátil, ideal para o estudo da composição de óleos voláteis e que a nova fase estacionária

quiral AM- β -CD, em fase de testes no NPPN, mostrou-se altamente eficiente na separação enantiomérica de terpenos e matrizes mais complexas como os óleos voláteis.

Através dos ensaios de atividade antimicrobiana verificou-se que os óleos voláteis de *P. latifolia* foram moderadamente ativos, principalmente contra os fungos *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*, não ocorrendo mudanças significativas na atividade dos óleos de plantas de diferentes procedências. As frações do extrato etanólico das raízes dessa espécie demonstraram um potencial antimicrobiano maior do que o observado nos óleos. Já o óleo volátil de *P. tetraphylla* não apresentou nenhum tipo de atividade antimicrobiana.

Os testes de letalidade contra *Artemia salina* revelaram que os óleos *P. latifolia* apresentaram uma alta toxicidade, podendo ser considerados com propriedades citotóxicas. Já os óleos de *P. tetraphylla* apresentaram uma toxicidade bem inferior, em relação aos óleos voláteis de *P. latifolia*.

Com o teste de atividade antioxidante, pelo método do DPPH, verificou-se que os óleos voláteis das duas espécies estudadas e seus constituintes não demonstraram atividade como trapeadores do radical livre DPPH, porém todas as frações do extrato etanólico de *P. latifolia* apresentaram alta atividade antiradicalar.

Com a conclusão deste trabalho, pode-se observar que existe a necessidade de uma continuação nas pesquisas sobre estas espécies de *Poiretia*, devido à importância da espécie *P. latifolia* como fonte de *R*-carvona enantiomericamente pura e ainda, pelas propriedades antioxidante e antimicrobiana apresentadas pelas frações do extrato etanólico de *P. latifolia*. Além disso, trata-se de espécies características da região Sul, muito pouco estudadas até o presente momento.