

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL

FLÁVIO AUGUSTO PRASERES VIEIRA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA DO
ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Hyptis Dilatata* BENTH**

São Luís – MA

2018

FLÁVIO AUGUSTO PRASERES VIEIRA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA DO
ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Hyptis Dilatata* BENTH**

Monografia apresentada à coordenação do curso de Química Industrial da Universidade Federal do Maranhão como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Química Industrial

Orientador: Prof. Dr. Odair dos Santos Monteiro.

São Luís – MA

2018

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Vieira, Flávio Augusto Praseres.

Estudo químico e avaliação da atividade microbiológica do óleo essencial das folhas de *Hyptis dilatata* Benth / Flávio Augusto Praseres Vieira. - 2018.

49 f.

Orientador(a): Odair dos Santos Monteiro.

Monografia (Graduação) - Curso de Química Industrial, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

1. Atividade antimicrobiana. 2. Composição química. 3. *Hyptis dilatata* Benth. 4. Óleo essencial. I. Monteiro, Odair dos Santos. II. Título.

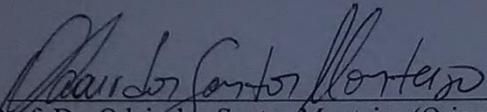
FLÁVIO AUGUSTO PRASERES VIEIRA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA DO
ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Hyptis Dilatata* BENTH**

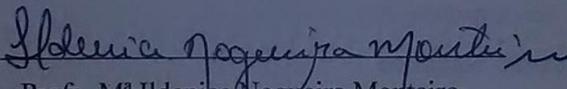
Monografia apresentada à coordenação do curso de Química Industrial da Universidade Federal do Maranhão como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Química Industrial

São Luís, 26 de JULHO de 2018

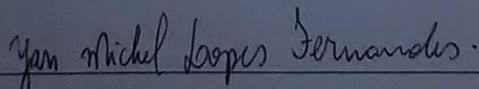
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Odair dos Santos Monteiro (Orientador)

Universidade Federal do Maranhão


Profª. M^a Ildenice Nogueira Monteiro

Faculdade Pitágoras


Prof. Yan Michel Lopes Fernandes

Universidade Federal do Maranhão

À entropia do universo que em constante expansão iniciou o caos por onde a existência humana pode prosperar em uma fração do tempo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Sol que por milênios tem provido as condições necessárias para a manutenção da própria vida no planeta Terra.

Ao professor Dr. Odair dos Santos Monteiro por ter me guiado durante todos esses anos de trabalho com produtos naturais em seu grupo de pesquisa, todos os ensinamentos por ele ministrados em suas aulas sobre química orgânica que tiveram um papel fundamental na tomada de decisões que me levaram a conclusão desse trabalho.

A minha mãe dona Lina, a quem sempre pude recorrer nos momentos mais difíceis da minha vida e quem sempre me apoiou e me incentivou a continuar quando eu mesmo havia desistido. Ao meu pai seu Fernando que sempre me ajudou a fazer escolhas difíceis e acreditou que eu seria capaz de finalizar minhas decisões.

Ao meu amigo de graduação e companheiro de pesquisa Yan Fernandes, que eu tenho o orgulho de considerar como meu melhor amigo e pude contar com a ajuda durante a graduação pelas dificuldades encontradas nas mais complicadas disciplinas e pela notória paciência em ter lidado comigo por todos esses anos.

Aos professores Arão Filho, Nestor Everton, Cláudia Rocha e Victor Elias Moucherek pelos ensinamentos sobre química orgânica e produtos naturais prestados durante esses anos e elucidações acerca desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido durante essa pesquisa.

Aos meus amigos de graduação e companheiros de laboratório com quem tive o prazer de trabalhar e compartilhar informações durante toda a graduação: Anderson Viana, Jacque Ribeiro, Evellin Enny, Thiago Bastos, Natale Cristine, Joaquim Castro, Ana Patrícia, Nathália Castro e Gislayne Jacinto.

Aos amigos que fiz durante minha jornada de aprendizado no IFMA: Lucas Gonçalves, Marina Jansen e Talita Martins.

Aos meus fisicamente distantes amigos porém próximos companheiros que conheci através do *Grand Chase* e compartilho até hoje dos momentos mais divertidos da minha vida: Tercio “Tsuki” Monsores, José “Jota” Américo, Gabriel “Reb” Silva, Iago “Aguim” Carvalho, Talles “Bode” Vinícius, Luís Henrique “Etheriwan” Parchen, Matheus “Hachiro”, Yasmin “Eris” Lima e Lucas “Lonestar” Viçoso.

A todos que viabilizaram direta ou indiretamente a realização desse trabalho.

RESUMO

A *Hyptis dilatata* Benth é conhecida popularmente como “hortelãzinho-do-mato” e pertence à família Lamiaceae. No Brasil apresenta ocorrência nas regiões norte e nordeste do país. O presente estudo apresenta a avaliação química e avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica do óleo essencial extraído das folhas de *Hyptis dilatata* B. As amostras vegetais foram coletadas no Parque Nacional das Nascentes do Rio Paraíba, na fronteira dos estados do Maranhão, Piauí, Tocantins e Bahia. O óleo foi extraído pelo processo de hidrodestilação no Laboratório de Produtos Naturais na UFMA e apresentou rendimento de 4,85%. Os constituintes químicos presentes no óleo foram caracterizados por CG-EM no Laboratório de Farmacognosia, que identificou 10 compostos e seus constituintes majoritários foram o limoneno (72,00%), β -pineno (11,31%) e p-cimeno (10,19%). A atividade antimicrobiana foi avaliada pela técnica de microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). As amostras foram oriundas do Laboratório de Microbiologia Clínica da UFMA. Foram utilizados microrganismos ATCC's (*American Type Culture Collection*) e isolados clínicos (IC). Foi verificada ação antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Hyptis dilatata* B. frente a *Escherichia coli* (ATCC 25922) com CIM e CBM de 65,5 μ L/mL e frente ao *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) com CIM e CBM de 125 μ L/mL. Quanto a avaliação antifúngica o óleo expressou atividade contra os fungos *Candida albicans* (IC) e *Candida glabrata* (IC) com CIM e CFM de 250 μ L/mL enquanto para os microrganismos *Candida albicans* (ATCC 90028) e *Candida parapsilosis* (IC) somente apresentou CIM de 250 μ L/mL. Diante a esses resultados propõe-se a utilização do óleo essencial de *Hyptis dilatata* B. como agente terapêutico complementar aos tratamento das enfermidades causadas por esses microorganismos.

Palavras-chave: Óleo essencial; *Hyptis dilatata* Benth; Composição química; Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Hyptis dilatata Benth is popularly known as "hortelãzinho-do-mato" and belongs to the Lamiaceae family. In Brazil, the species can be found in the northern and northeastern of the country. This study describes the chemical analysis and evaluation of the antibacterial and antifungal activity of the essential oil extracted from the leaves of *Hyptis dilatata* B. The samples were collected from Parque Nacional das Nascentes do Rio Paraíba, on the border of the states of Maranhão, Piauí, Tocantins, and Bahia. The oil was extracted by the hydrodistillation process at the Laboratório de Produtos Naturais at UFMA and showed a yield of 4.85%. The chemical constituents present in the oil were identified by CG-MS at the Laboratório de Farmacognosia, which led to the identification of 10 compounds, and their major constituents were limonene (72.00%), β -pinene (11.31%) and p-cymene (10.19%). The antimicrobial activity was evaluated by broth microdilution technique for the determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC). The samples were from the Laboratório de Microbiologia Clínica at UFMA. ATCC's (American Type Culture Collection) and clinical isolates (CI) were used. Antimicrobial action of the essential oil of leaves of *Hyptis dilatata* B. against *Escherichia coli* (ATCC 25922) expressed MIC and MBC of 65.5 μ L/mL and against *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) with MIC and MBC of 125 μ L/ml. Regarding the antifungal evaluation, the oil expressed activity against the fungi *Candida albicans* (IC) and *Candida glabrata* (IC) with MIC and MFC of 250 μ L/mL whereas for the microorganisms *Candida albicans* (ATCC 90028) and *Candida parapsilosis* (IC) only presented MIC of 250 μ L/mL. In view of these results, it is proposed to use the essential oil of *Hyptis dilatata* B. as a therapeutic agent complementary to the treatment of the diseases caused by these microorganisms.

Keywords: Essential oil; *Hyptis dilatata* Benth; Chemical composition; Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rotas de biossíntese de metabolitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário das plantas	18
Figura 2: Unidades C ₅ de IPP e DMAPP unem-se para formar uma unidade de GPP (C ₁₀) .	19
Figura 3: Unidades C ₁₀ (GPP) e C ₅ (IPP) unem-se para formar uma unidade de FPP (C ₁₅) .	19
Figura 4: Monoterpenos derivados de GPP, LPP e NPP e seus representantes aromáticos...	20
Figura 5: Unidade de isopentano.....	21
Figura 6: Unidade isoprênica.....	21
Figura 7: Formação “cauda-cauda”	21
Figura 8: Formação “cabeça-cauda”	21
Figura 9: Visão superior de um espécime de <i>Hyptis dilatata</i> B.....	23
Figura 10: Visão aproximada das folhas e flores de <i>Hyptis dilatata</i> B.....	23
Figura 11: Mapa da localização Parque Nacional das Nascentes do Rio Parnaíba	27
Figura 12: Sistema de Hidrodestilação e Banho Ultratermostático	28
Figura 13: Extrator de Clevenger modificado.....	28
Figura 14: Balança analítica de precisão 0,1 mg.....	29
Figura 15: Medidor de umidade por infravermelho	29
Figura 16: Centrífuga	30
Figura 17: Ampolas de vidro âmbar contendo óleo essencial (a esquerda) e aberta (a direita)	30
Figura 18: Ilustração do óleo essencial observado no refratômetro.....	34
Figura 19: Exsicata da <i>Hyptis dilatata</i> Benth.....	37
Figura 20: Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>Hyptis dilatata</i> B.	39
Figura 21: Espectro de massas do limoneno	40
Figura 22: Fórmula estrutural do limoneno.....	40
Figura 23: Fragmentação do limoneno pro reação de retro-Diels-Alder	40
Figura 24: Espectro de massas do β-pineno	41
Figura 25: Fórmula estrutural do β-pineno	41
Figura 26: Espectro de massas do p-cimeno	42
Figura 27: Fórmula estrutural do p-cimeno.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Especificações do sistema em conjunto CG-EM utilizado na análise de composição do óleo de <i>Hyptis dilatata</i> B.	31
Tabela 2. Características físico-químicas do óleo essencial extraído das folhas de <i>Hyptis dilatata</i> B.	38
Tabela 3. Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de <i>Hyptis dilatata</i> B.	39
Tabela 4. Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de <i>Hyptis dilatata</i> B.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil CoA – Acetilcoenzima A

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI – *Brain Heart Infusion*

BLU – Base Livre de Umidade

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CG – Cromatografia gasosa

CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DMAPP – Dimetil-alil difosfato

EM – Espectrometria de massas

FPP – Farnesil difosfato

GPP – Geranil difosfato

IC – Isolados clínicos

IPP – Isopentenil difosfato

IRB – Índice de Retenção da Biblioteca

IRC – Índice de Retenção Calculado

LABMIC – Laboratório de Microbiologia Clínica

LPN – Laboratório de Produtos Naturais

LPP – Pirofosfato de linalila

m/m – massa/massa

m/z – Razão massa/carga

MEP – Metil-eritritol fosfato

MPEG – Museu Paraense Emílio Goeldi

NPP – Pirofosfato de nerila

TR – Tempo de retenção na coluna cromatográfica

UFMA – Universidade Federal do Maranhão

v/m – volume/massa

SUMÁRIO

RESUMO.....	06
ABSTRACT	07
LISTA DE FIGURAS.....	08
LISTA DE TABELAS	09
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo Geral.....	15
2.2. Objetivos Específicos	15
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
3.1. Plantas aromáticas.....	16
3.2. Óleos Essenciais	16
3.2.1. Rotas biossintéticas de formação dos metabólitos secundários	17
3.2.1.1. Terpenos	18
3.2.1.2. Compostos fenólicos	22
3.2.1.3. Compostos nitrogenados	22
3.3. Família Lamiaceae, Gênero <i>Hyptis</i> , Espécie <i>Hyptis dilatata</i> (B.).....	22
3.4. Técnicas analíticas de identificação da composição química de Óleos Essenciais	24
3.4.1. Cromatografia gasosa.....	24
3.4.2. Espectrometria de massas por impacto eletrônico	25
3.5. Atividade antimicrobiana de Óleos Essenciais	25
4. METODOLOGIA.....	27
4.1. Coleta do material botânico	27
4.2. Materiais e equipamentos	28

4.2.1. Sistema de hidrodestilação	28
4.2.2. Balança analítica	29
4.2.3. Analisador de umidade por infravermelho.....	29
4.2.4. Centrífuga.....	30
4.2.5. Ampolas de vidro âmbar	30
4.2.6. Sistema em conjunto de cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas	31
4.3. Metodologia experimental	31
4.3.1. Identificação botânica	31
4.3.2. Extração por hidrodestilação.....	32
4.3.3. Cálculo do rendimento	33
4.3.4. Densidade	34
4.3.5. Índice de Refração.....	34
4.3.6. Caracterização química e quantificação de componentes	34
4.3.7. Atividade antimicrobiana	35
4.3.7.1. Seleção de cepas bacterianas e fúngicas.....	35
4.3.7.2. Preparo das suspensões microbianas	35
4.3.7.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM)	36
4.3.7.4. Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1. Identificação botânica das excisatas	37
5.2. Rendimento e características físico-químicas	38
5.3. Identificação e quantificação dos constituintes do óleo essencial de <i>Hyptis dilatata</i> Benth	38
5.4. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial	42
6. CONCLUSÃO.....	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1. INTRODUÇÃO

Conforme a humanidade vai evoluindo a sua necessidade em encontrar novos recursos provenientes da natureza se torna mais intensa. Seja voltado para a indústria de celulose, para o setor agrícola quanto para a aplicação bioquímica. Tirar proveito desses recursos requer ampla pesquisa e aprimoramento dos conhecimentos adquiridos pela química e pela biologia. Através da intersecção dessas duas áreas, um vasto campo de estudo da biodiversidade pode ser explorado visando a expansão dos conhecimentos e a melhoria da qualidade de vida da população.

A busca por recursos da natureza para combater enfermidades é um comportamento humano já conhecido. Na sociedade moderna, a produção sintética adquiriu um vasto espaço na indústria farmacêutica. Porém, mesmo com o aprimoramento constante dessa tecnologia, os recursos naturais ainda nos fornecem uma infinidade de compostos capazes de suprir nossas necessidades de forma tão eficiente ou mesmo melhor que os produtos sintéticos.

Segundo Jorge (2003), desde o ano 3000 a.C há dados de que a china destacava-se no cultivo e estudo de plantas medicinais, sendo o Imperador Sheng-Nung responsável pelo teste de diversas plantas em seu próprio corpo com objetivo de saber o efeito que elas provocavam. Tais experiências resultaram na escrita do "Cânone das Ervas" que conta com informações de mais de 200 plantas. Entre elas se destaca a raiz de ginseng, anunciando ser a mais incrível erva e que fornecia a longevidade.

Machado e Junior (2011) citam que “as terapias naturais têm como origem as chamadas medicinas tradicionais, tendo estas sido acrescidas de novas tecnologias e pesquisas, sendo comumente chamadas de terapias complementares ou alternativas.”

Durante séculos os produtos naturais têm servido para a humanidade diversas formas de benefícios. Sejam através de seus metabólitos primários que geram produtos com funções estruturais e energéticas das plantas (por exemplo a glicose) como, também, os metabólitos secundários cuja função não está diretamente voltada as necessidades primárias das plantas, como a defesa e reprodução (TAIZ & ZEIGER, 2006).

Os óleos essenciais ou essências, derivados principalmente dos terpenos, possuem compostos de baixo peso molecular e, por isso, são bastante voláteis. Sua função pode ser tanto atraindo seus polinizadores quanto repelindo seus predadores (KROLOW; VIZZOTTO & WEBER, 2010).

Abu Ali-Husain Ibn Abdalah Ibn Sina, conhecido no ocidente como Avicenna (980 – 1037) foi um dos maiores filósofos islâmicos, voltado à química, física, astronomia, filosofia

e matemática. Seu maior marco foi a descoberta da movimentação de fluídos sem a necessidade de impulsão mecânica, apenas com a capilaridade. Através disso, Avicenna conseguiu realizar a extração do óleo essencial de rosas dando origem a água de rosas, isolando a fragrância da flor. A partir desse processo nasce o princípio da destilação de óleo voláteis de plantas (RAGGI, 2013).

Conforme o exposto, é possível notar o importante histórico das dos produtos naturais e dos óleos essenciais em diferentes civilizações no decorrer da história. Esta importância somente se intensificará na idade moderna e contemporânea pela necessidade de meios mais biosustentáveis de proteção e crescimento das lavouras na agricultura, assim como a competição de diversas indústrias cosméticas em busca dos mais requintados aromas que a natureza pode oferecer aos seus produtos.

O estudo sobre os óleos voláteis tem se intensificado graças ao interesse farmacológico, cosméticos e agroalimentícios na aplicação de, não somente de suas propriedades organolépticas, como odor agradável, mas também de suas características químicas como suas capacidades antioxidantes e antimicrobianas, auxiliando o combate à doenças e processos de deterioração por oxidação (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004; SINGH *et al.*, 2007 apud ANDRADE et al., 2012).

A espécie *Hyptis dilatata* Benth coletada no Estado de Roraima apresentou óleo essencial com os principais constituintes químicos α -pineno (11,92%), 3-careno (12,45%), D-limoneno (8,10%), Biciclo[2.2.1] heptan-2-ona-1,3,3-trimetil (10,59%), cariofileno (6,08%) (MORAES, NASCIMENTO & OLIVEIRA, 2014). Já o óleo coletado de amostras provenientes do Estado do Maranhão teve como componentes majoritários canfôra (16,0%), p-cimeno (10,5%) e δ -3-careno (9,5%). (MELO, 2013).

Dito isso, fica evidente o valor intelectual que se pode obter através dos estudos de óleo essencial, especialmente de plantas extraídas em locais distintos ao comparar os constituintes químicos desses óleos. Fica claro, também, o potencial para aplicação em produtos de interesse social ou econômico que possam substituir os produtos sintéticos atuais por alternativas mais ecológicas e eficientes.

Este estudo tem foco no óleo essencial da espécie vegetal *Hyptis dilatata* Benth encontrada no Parque Nacional das Nascentes do Rio Parnaíba, tais quais suas características químicas, antifúngicas e antibacterianas, proporcionando assim um referencial para futuros trabalhos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial químico e farmacológico do óleo essencial das folhas de amostras de *Hyptis dilatata* B. encontradas no Parque Nacional das Nascentes do Rio Parnaíba.

2.2. Objetivos Específicos

- Coletar amostras vegetais aromáticas em condições naturais no cerrado maranhense;
- Identificar botanicamente as amostras a partir de suas exsicatas;
- Extrair os óleos essenciais das amostras a partir do método de hidrodestilação;
- Caracterizar quimicamente os óleos essenciais por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e quantificar seus componentes assim como seus compostos majoritários;
- Verificar a ação dos óleos essenciais contra diversas espécies de fungos e bactérias, tais qual as suas concentrações inibitórias mínimas e antimicrobianas mínimas e propor uma aplicação para estes óleos voláteis a partir de seus resultados apresentados.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Plantas aromáticas

No Brasil tem-se registro da utilização de plantas na cultura indígena, através do uso de jaborandi e guaraná; das espécies africanas como a erva-de-São-Caetano e o boldo e das espécies europeias como a camomila e a malva. Atualmente o uso dessas plantas não se restringe apenas as zonas rurais ou desprovidas de assistência médica. Elas são amplamente utilizadas como método complementar a medicina oficial (MOUCHEREK, 2000).

Estima-se que aproximadamente 80% da população mundial utiliza os conhecimentos da medicina tradicional para o tratamento de enfermidades, em especial àquelas cujas terapias envolve o uso de fitoterápicos (MACHADO & JUNIOR. 2011).

3.2. Óleos Essenciais

São chamados de óleos essenciais, óleos voláteis ou óleos etéreos (devido ao seu forte aroma e solubilidade em solventes orgânicos) as misturas provenientes de plantas aromáticas durante o seu metabolismo secundário e geralmente possuem dezenas de compostos (MALINOWSKI, 2010). Normalmente são extraídos em países quentes como os do mediterrâneo e dos trópicos e possuem grande relevância para os estudos fitoquímicos (MACHADO & JUNIOR. 2011).

Esses óleos voláteis são constituídos de compostos provenientes de dois grupos derivados do metabolismo secundários das plantas: os terpenóides e os fenilpropanóides, sendo que geralmente há uma predominância maior do primeiro grupo (BRUM, 2012).

Segundo Azambuja (2012), fatores como solo, clima, altitude, época de colheita e cuidados com o cultivo das plantas podem influenciar na concentração e na qualidade de seus óleos essenciais. Estes óleos estão presentes entre a células das plantas e possuem uma função semelhante aos hormônios das espécies do reino animal, como reguladores e catalizadores. Em situações de estresse, por exemplo, a sua produção pode aumentar ou diminuir em resposta a esses estímulos externos.

Conforme Brum (2012), esses óleos podem ser produzidos e armazenados em diferentes órgãos do vegetal, como folhas, caule, flores, rizomas, frutos ou sementes. Essa diferenciação pode promover a produções completamente distintas de óleos voláteis de uma mesma planta extraídos de órgãos vegetais diferentes. Por exemplo, o óleo extraído das folhas de

Cinnamomum zeylanicum (canela) é rico em eugenol, enquanto o óleo extraído das cascas do caule possui alto teor de aldeído cinâmico.

3.2.1. Rotas biossintéticas de formação dos metabólitos secundários

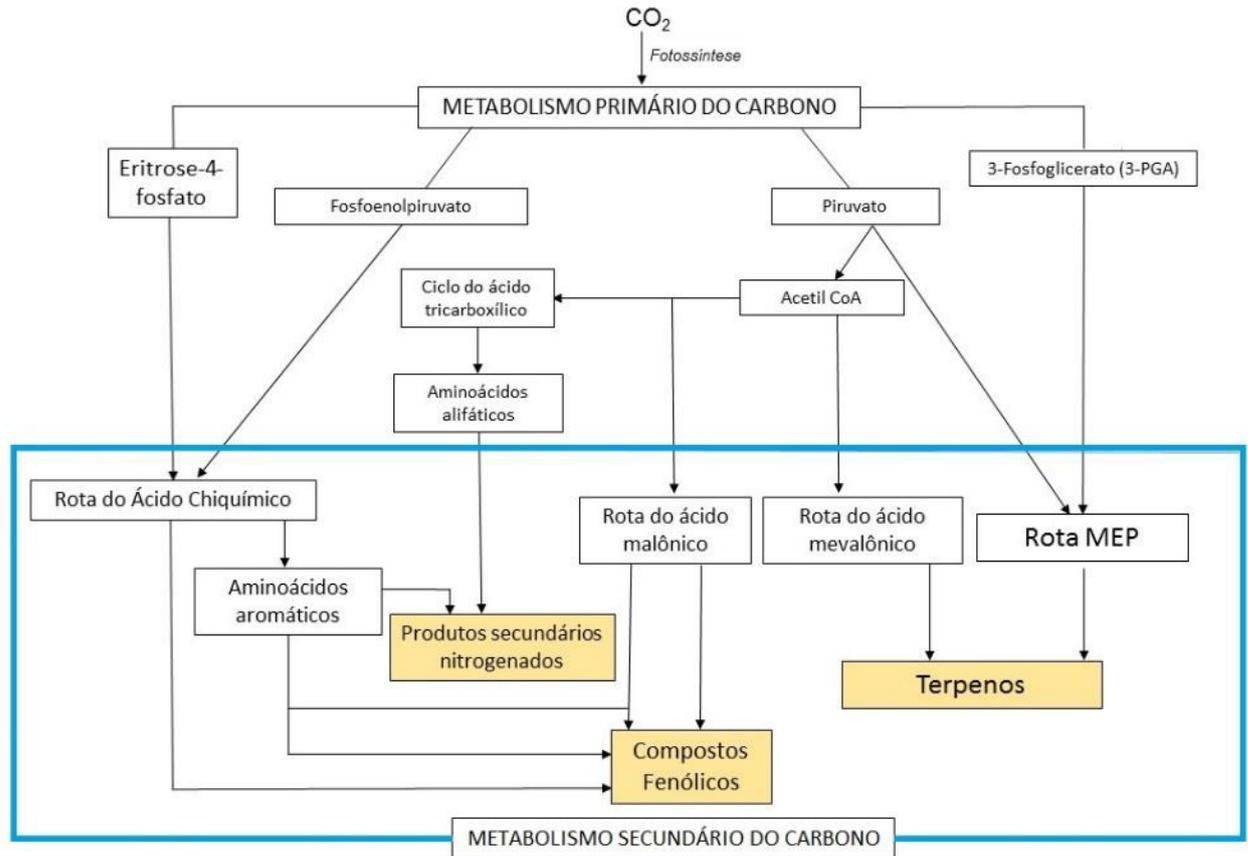
Enquanto o metabolismo primário está ligado ao crescimento e desenvolvimento da planta, o metabolismo secundário fornece as mesmas componentes importantes para suas funções biológicas de sobrevivência e adaptação ao meio em que se encontram. A composição dos óleos essenciais está diretamente ligada as substancias produzidas por esses processos bioquímicos (FERNANDES, 2017).

Os metabólitos secundários se apresentam de forma restrita no reino animal. Diferentemente dos metabólitos primários (aminoácidos, açúcares e nucleotídeos) que podem ser encontrados em todo o reino *Plantae*, os secundários ocorrem em espécies ou grupos espécies relacionados entre si (TAIZ & ZEIGER, 2006).

Prins et al. (2010) afirma que, uma vez que os óleos essenciais são muito tóxicos para as células vegetais, há diversas estruturas especializadas em produzir e armazenar esses óleos, como os tricomas glandulares, cavidades secretoras, idioblastos, entre outros.

Os metabólitos são separados conforme a rota que percorreram ao serem desenvolvidos. Estes são classificados em 3 grupos: os terpenos, os compostos fenólicos e os compostos nitrogenados (TAIZ & ZEIGER, 2006). A seguir estão ilustrados as principais rotas de biossíntese do metabolismo secundários das plantas, com suas respectivas interações com o metabolismo primário dos vegetais.

Figura 1: Rotas de biossíntese de metabolitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário das plantas.



Fonte: Reproduzido pelo autor (FERNANDES, 2017, p.24; TAIZ & ZEIGER, 2006, p.312).

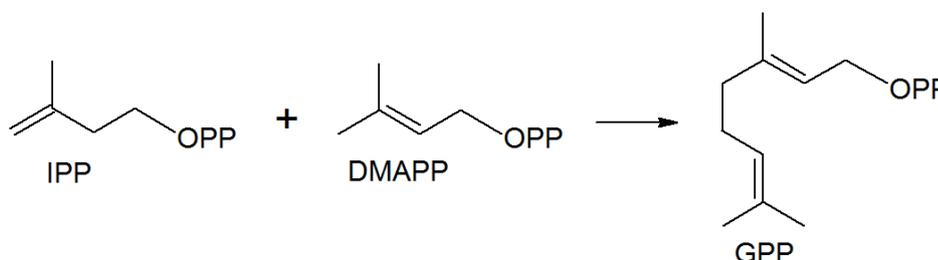
3.2.1.1. Terpenos

Os terpenos, ou terpenóides, são o maior grupo de metabólitos secundários. Possuem, em geral, baixa solubilidade em água e são sintetizados a partir da acetilcoenzima A (acetil CoA) ou de intermediários glicolíticos. Através da reação de três moléculas de acetil CoA tem-se a formação do ácido mevalônico. Este passa por processo de pirofosforilação, descarboxilação e desidratação resultando em uma molécula de isopentenil difosfato (IPP), a unidade base ativa da formação de terpenóides. Também há formação de IPP por intermediários glicóticos através da rota do metil-eritritol fosfato (MEP) (TAIZ & ZEIGER, 2006).

Através da isomerização do IPP por IPP isomerase tem-se a formação de dimetil-alil difosfato (DMAPP). Este liga-se com uma molécula de IPP para formar o geranyl difosfato (GPP), que é a base dos monoterpenos (possuindo 10 carbonos), geralmente produzido pela rota do mevalonato (Figura 2). O GPP pode reagir com outra molécula de IPP para formar o

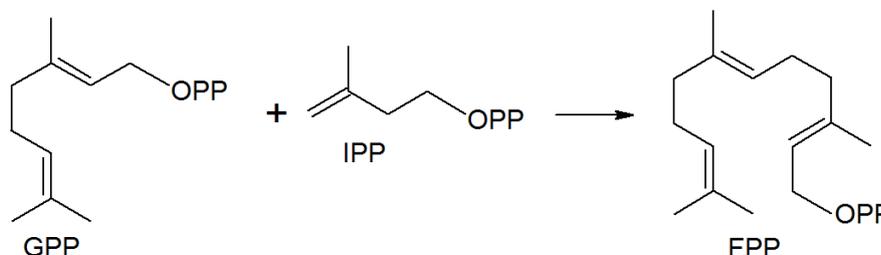
farnesil difosfato (FPP), a base dos sesquiterpenos (15 carbonos), produzidos pela rota MEP (Figura 3) (BAŞER & BUCHBAUER, 2010; PETERSEN, 2006; TAIZ & ZEIGER, 2006).

Figura 2: Unidades C₅ de IPP e DMAPP unem-se para formar uma unidade de GPP (C₁₀).



Fonte: Criado pelo autor (ChemSketch) baseado em (PRINS et al. 2010, p. 94).

Figura 3: Unidades C₁₀ (GPP) e C₅ (IPP) unem-se para formar uma unidade de FPP (C₁₅).

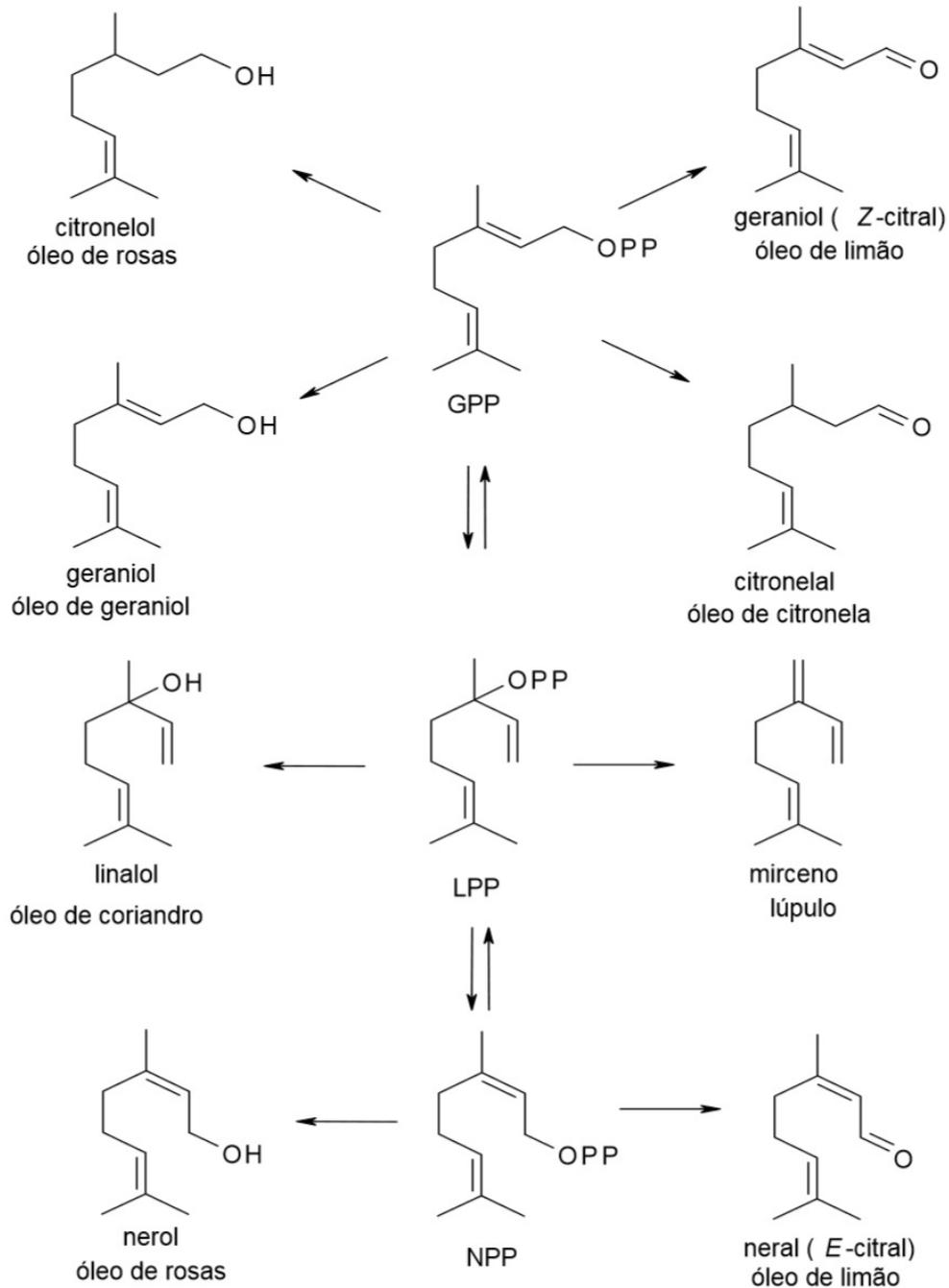


Fonte: Criado pelo autor (ChemSketch) baseado em (PRINS et al. 2010, p. 94).

A dupla ligação formada na unidade GPP possui, normalmente, uma configuração trans. Entretanto, o GPP pode sofrer modificações em sua ligação dupla, formando isômeros de pirofosfato de linalila (LPP) e pirofosfato de nerila (NPP), possibilitando a formação de diferentes monoterpênicos (PETERSEN, 2006).

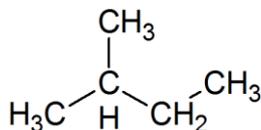
Unidades IPP, DMAPP, GPP e FPP podem, ainda, continuar seu encadeamento e formar moléculas de 20 (diterpenos), 30 (triterpenos) ou mesmo 40 carbonos (tetraterpenos). Porém devido ao alto peso molecular, a volatilidade desses compostos diminui consideravelmente, eliminando-os da composição dos óleos essenciais, cuja principal característica é sua notável aromaticidade (BAŞER & BUCHBAUER, 2010).

Figura 4: Monoterpenos derivados de GPP, LPP e NPP e seus representantes aromáticos.

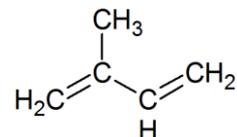


Fonte: Reproduzido e editado pelo autor (PETERSEN, 2006, p. 40).

As estruturas dos terpenos podem ser visualizadas como compostas por unidades de 5 carbonos com a estrutura semelhante a do isopentano (Figura 5). Essas estruturas básicas podem ser chamadas de unidades isoprênicas (Figura 6), graças a capacidade dos terpenos em serem decompostos em isoprenos quando submetidos a altas temperaturas (TAIZ & ZEIGER, 2006).

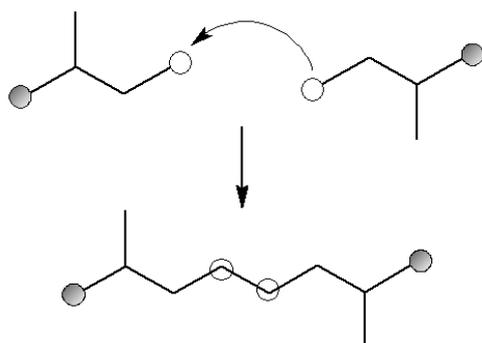
Figura 5: Unidade de isopentano.

Fonte: Autor (ChemSketch).

Figura 6: Unidade isoprênica.

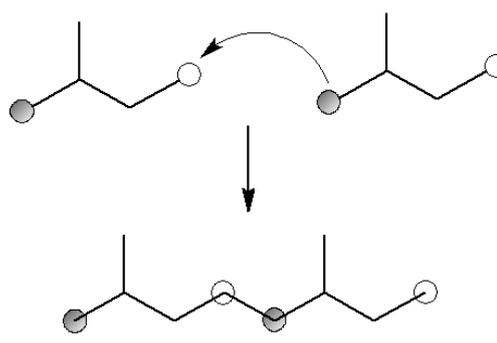
Fonte: Autor (ChemSketch).

Os monoterpenos podem se formar através da união dessas unidades isoprênicas através de 2 configurações características: a formação “cabeça-cabeça” ou “cauda-cauda”, que consiste na interligação de duas extremidades semelhantes, e também através da formação “cabeça-cauda” na qual duas extremidades distintas se interligam (BAŞER & BUCHBAUER, 2010). A seguir, é possível acompanhar esse raciocínio através das ilustrações nas Figuras 7 e 8.

Figura 7: Formação “cauda-cauda”.

● : Cabeça ○ : Cauda

Fonte: Criado pelo autor (ChemSketch) baseado em (BAŞER & BUCHBAUER, 2010, p. 130).

Figura 8: Formação “cabeça-cauda”.

● : Cabeça ○ : Cauda

Fonte: Criado pelo autor (ChemSketch) baseado em (BAŞER & BUCHBAUER, 2010, p. 130).

Apesar de serem representados por unidades isoprênicas, o isopreno raramente é encontrado em óleos essenciais ou sequer é um intermediário entre as já conhecidas rotas biossintéticas (BAŞER & BUCHBAUER, 2010). Entretanto, essa estrutura pentacarbonada auxilia na visualização da formação dos terpenos e sugere como ocorrem as diferenciações na geometria de terpenóides isômeros encontrados em óleos voláteis.

3.2.1.2. Compostos fenólicos

Assim como os terpenos, diversas plantas produzem compostos que contém pelo menos um grupo fenol durante seu metabolismo secundário. Esses compostos são bissintetizados por duas rotas: via ácido chiquímico e via ácido malônico. Essas substâncias conferem ao óleo essencial uma certa solubilidade em água e apresentam uma variedade de funções para a planta, como odor, sabor e cor (TAIZ & ZEIGER, 2006).

Há estudos que associam aos compostos fenólicos liberados no solo podem estar ligados a inibição do crescimento de plantas vizinhas pela disputa de recursos minerais, hídricos e de luminosidade de uma planta que produz essas substâncias. Essa reação constitui um efeito alelopático que, em geral, define uma diversidade de efeitos benéficos ou maléficos de uma plantas em relação aos espécimes adjacentes da mesma (SANTOS et al., 2011; TAIZ & ZEIGER, 2006).

3.2.1.3. Compostos nitrogenados

Há uma grande diversidade de plantas que produzem metabólitos secundários nitrogenados como alcaloides e glicosídeos cianogênicos. Estes são sintetizados a partir de aminoácidos comuns e possuem notáveis funções de proteção para a planta. Acredita-se que os alcaloides atuam como um sistema de defesa dos vegetais, especialmente contra mamíferos, devido a sua acentuada toxicidade contra estes predadores. Os glicosídeos cianogênicos são precursores do ácido cianídrico, um potente veneno volátil capaz de inibir a alimentação de insetos e outros herbívoros (TAIZ & ZEIGER, 2006).

3.3. Família Lamiaceae, Gênero *Hyptis*, Espécie *Hyptis dilatata* (B.)

Pertencente à ordem Tubiflorae Lamiales, a família Lamiaceae possui aproximadamente 200 gêneros e por volta de 3200 espécies catalogadas distribuídas em todo o mundo. Dentre elas, há diversas espécies brasileiras de destaque na literatura, como a *Hyptis suaveolens* L. (alfavacão), *Hyptis mutabilis*, *Melissa officinalis* L. (erva-cidreira), *Mentha piperita* L. (hortelã), *Ocimum basilicum* L. (majericão), entre outras (LIMA & CARDOSO, 2007).

O gênero *Hyptis* é utilizado para fins medicinais não somente no Brasil, mas em países como o México, Índia, China, Equador, Tailândia, Panamá, Nigéria e outros países da África. No México, por exemplo, diversas plantas desse gênero são usadas na medicina popular para

tratar casos de esterilidade, problemas digestivos, ansiedade, depressão, queda de cabelo e tosse (FALCÃO & MENEZES, 2003)

A espécie *Hyptis dilatata* Benth é conhecida como hortelãzinho-do-mato, devido a sua semelhança com algumas espécies do gênero *Mentha* (FERNANDES, 2017). É uma espécie nativa não endêmica do Brasil e apresenta ocorrência nas regiões norte e nordeste do país. Possui haste ereto, flores e folhas sésseis e muitos pelos em toda a sua superfície foliar (RIBEIRO, 2016).

Figura 9. Visão superior de um espécime de *Hyptis dilatata* B.



Fonte: Foto do autor.

Figura 10. Visão aproximada das folhas e flores de *Hyptis dilatata* B.



Fonte: Foto do autor.

Os óleos essenciais coletados das folhas de três amostras desta espécie foram caracterizados por Maia & Andrade (2009), que mostraram possuir distintos compostos majoritários em sua composição. A primeira amostra apresentou teor de 27,9% de 1,8-cineol, 16,8% de β -cariofileno e 14,8% de cânfora. A segunda foi quantificada com 31,3% de fenchona, 18% de δ -3-careno e 13,3% de β -cariofileno. Já a terceira apresentou 26,4% α -pineno, 21,5% 1,8-cineol, 18,3% biciclogermacreno e 21,5% 1,8-cineol.

Ribeiro (2016) evidenciou a atividade moluscicida do óleo volátil frente ao *Biomphalaria glabrata*, indicando a possibilidade do uso do mesmo para o controle da esquistossomose, tendo em vista que o parasita *Schistosoma mansoni* utiliza este caramujo como vetor de propagação da doença.

3.4. Técnicas analíticas de identificação da composição química de Óleos Essenciais

Devido à natureza química dos óleos essenciais faz-se necessário o emprego de uma ou mais técnicas analíticas visando a separação e posterior identificação dos componentes químicos presentes em determinado óleo.

A avaliação quantitativa e qualitativa de um óleo essencial, assim como na ciência em geral, requer um padrão de reprodutibilidade que assegure a veracidade dos resultados obtidos. Sendo assim, técnicas de separação e identificação como a Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) são amplamente utilizadas com a finalidade de qualificar os óleos voláteis (MONTEIRO, 2008).

3.4.1. Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa (CG) é um método de separação que se baseia nas interações intermoleculares da amostra vaporizada com uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa).

A amostra vaporizada na entrada do cromatógrafo através de um sistema de injeção aquecido e entra em uma coluna cromatográfica onde, devido as interações intermoleculares com a fase estacionária, retém as moléculas por tempos distintos, viabilizando a saída desses compostos da coluna em tempos diferentes para que possam ser identificados em um detector apropriado (COLLINS et al., 1997). É uma técnica amplamente utilizada como método de separação dos componentes de óleos essenciais devido sua mais notável característica, a volatilidade de seus vários constituintes.

A técnica de desenvolvimento usada em cromatografia gasosa é a eluição. A fase móvel da cromatografia gasosa é um gás de arraste inerte em fluxo contínuo na coluna. A amostra é vaporizada ao ser introduzida rapidamente nessa corrente de gás e então é arrastada através da coluna. As substâncias, já separadas, chegam em tempos distintos ao detector, que gera um sinal para cada fração da amostra, registrando picos no formato de um cromatograma. A temperatura da coluna pode sofrer uma variação, linear ou não, sendo chamada de cromatografia gasosa com temperatura programada. Durante a análise a temperatura da coluna sofre uma elevação, diminuindo a retenção de substâncias com maior ponto de ebulição. A programação da temperatura fornece condições para que haja uma maior simetria

dos picos e uma melhor detectabilidade para aqueles picos com tempos de retenção excessivamente grandes (COLLINS et al., 1997).

3.4.2. Espectrometria de massas por impacto eletrônico

A técnica de espectrometria de massas (EM) por impacto de elétrons pode ser definida como uma técnica analítica de identificação de substâncias através da determinação de suas massas moleculares em forma iônica baseado na movimentação desses íons em um campo eletromagneticamente carregado. Esse movimento é determinado pela razão massa/carga (m/z) do analito após o bombardeamento de elétrons de alta energia, resultando em fragmentos altamente energéticos. Esses fragmentos passam por um campo magnético que os separa baseados pelo m/z de cada íon, chegando ao detector que converte cada sinal em um espectro (SOUZA, 2008).

Os espectros podem ser apresentados de forma gráfica ou tabelada sendo o gráfico mais vantajoso por expor as sequências de fragmentação que podem ser reconhecidas com mais facilidade conforme o uso da técnica. A abundância relativa dos picos em comparação ao pico base (o íon que representa 100%) também pode ser fornecida pelo espectro gráfico (MONTEIRO, 2008).

Com a modernização dessas duas técnicas analíticas, diversas empresas passaram a investir em equipamentos de cromatografia gasosa em conjunto com um espectrômetro de massas (CG-EM). Esse artifício aumenta a concentração de amostra no gás de arraste, aproveitando a maior difusão do gás. As velocidades de varredura são capazes de processar cada espectro de massa por pico eluído do cromatógrafo (MONTEIRO, 2008).

Entretanto, vale salientar que a amostra injetada no CG-EM é destruída no processo, fazendo com que cada injeção custe uma nova parcela da amostra original (BAŞER & BUCHBAUER, 2010). Contudo, esse processo faz uso de pequenas quantidades de amostra, um fator crucial para a determinação do método de identificação química em diversos trabalhos com óleos essenciais de plantas que apresentam baixo rendimento.

3.5. Atividade antimicrobiana de Óleos Essenciais

Em virtude da constante evolução dos microrganismos, a resistência de bactérias aos antibióticos tem se tornado um problema de saúde pública. Tal condição tem voltado a indústria farmacêutica à buscar soluções na área de produtos naturais, dando atenção especial

a espécies de plantas já conhecidas e utilizadas pela medicina popular. A pesquisa investida nos produtos naturais tem resultando na descoberta de terapias complementares tanto para doenças infecciosas quanto para o tratamento do câncer e de imunodeficiências (CARVALHO, 2012).

Trajano et al. (2009) evidenciam que diversos vegetais exercem uma estabilidade contra a ação microbiana. Essas espécies de plantas apresentam uma alta carga microbiana e que, ao longo das estações, observa-se um crescimento lento ou mesmo a total erradicação dessas populações de microrganismos.

Carvalho (2012) descreve que, geralmente, os mecanismos de ação dos produtos naturais ocorrem na membrana citoplasmática das bactérias, causando danos às proteínas ali presentes. Ocorre, também, a interrupção do fluxo de elétrons, do transporte ativo e da coagulação dos conteúdos celulares.

Acerca da atividade biológica de óleos essenciais, Castro (2015) evidenciou a eficiente ação inibitória do óleo essencial das folhas de *Ocimum gratissimum* coletado em março de 2014 frente ao fungo *Corynespora cassiicola*, inibindo seu crescimento em na concentração de 0,7 µL/mL. Esse mesmo óleo é rico em timol (48,8%) e γ-terpineno (31,3%), condizendo com a literatura que, segundo Koba et al. (2009), afirma que o potencial antifúngico do OE de *Ocimum gratissimum* é uma consequência direta do seu alto teor de timol.

Já Carvalho (2012) extraiu o óleo volátil das folhas de *Lippia gracilis* Schum e seus resultados apresentaram uma promissora atividade antimicrobiana frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* com Concentração Inibitória Mínima de 100 µg/mL.

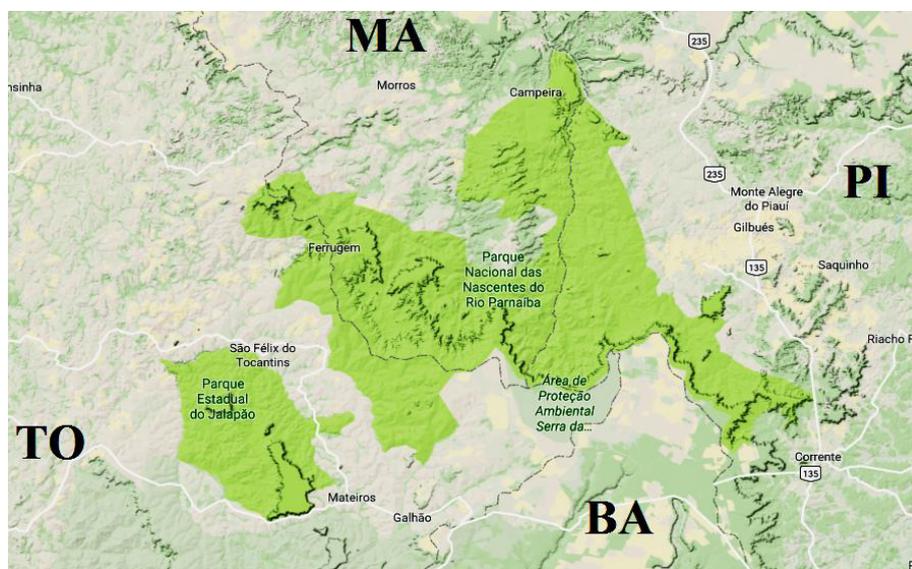
4. METODOLOGIA

4.1. Coleta do material botânico

A pesquisa se desenvolveu durante os anos de 2014 a 2018 em diferentes etapas tais como: coletas de amostras vegetais de diversas espécies de plantas, identificação das espécies a partir de suas exsicatas, extração dos óleos essenciais, análise de composição química e testes antimicrobianos.

As coletas foram realizadas no mês de maio de 2014 durante uma expedição pelo Parque Nacional das Nascentes do Rio Parnaíba (ver Figura 11). O parque fica localizado nos platôs da Chapada das Mangabeiras e da Serra da Tabatinga, foi projetado para proteger as nascentes do Rio Parnaíba, segunda maior bacia hidrográfica do nordeste, da degradação de seus recursos naturais pela ocupação desregrada na região. Com extensão territorial de 729.813,55 hectares, o parque abrange os estados do Maranhão (46,2%), Piauí (35,8%), Tocantins (14,6%) e Bahia (3,4%) (IBAMA, 2007).

Figura 11. Mapa da localização Parque Nacional das Nascentes do Rio Parnaíba.



Fonte: Editado pelo autor (Google Maps).

Durante essa etapa de campo a equipe coletou 27 espécies de plantas aromáticas levando em conta suas características organolépticas como cor e, principalmente, os odores exalados por elas, visando potenciais plantas com bom rendimento de óleo essencial para posterior extração. As amostras foram levadas para o Laboratório de Produtos Naturais (LPN)

no Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). As exsiccatas de cada uma delas foram preparadas e enviadas para o Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) para a realização de suas identificações botânicas.

Todas as amostras que chegaram ao LPN passaram por um processo prévio de secagem em temperatura ambiente e foram submetidas ao processo de hidrodestilação, que será explorado a seguir, com extrator de Clevenger modificado. Os óleos coletados foram separados em ampolas de vidro âmbar até 10 mL e armazenados sob refrigeração e em ausência de luz, proporcionando a conservação para futuros testes.

4.2. Materiais e equipamentos

4.2.1. Sistema de hidrodestilação

O sistema é composto por um balão de fundo redondo de 1000 mL levado à uma manta aquecedora. Ao balão está ligado um Clevenger modificado, aonde os vapores de água e óleo serão coletados. Na conexão superior do Clevenger está acoplada a um condensador por onde circula uma solução hidroalcolica refrigerada por um banho ultratermostático, modelo Q214S, QUIMIS.

Figura 12: Sistema de Hidrodestilação e Banho Ultratermostático.



Fonte: Foto do autor.

Figura 13: Extrator de Clevenger modificado.



Fonte: Foto do autor.

4.2.2. Balança analítica

Modelo SHIMADZU AUY220 UniBloc de precisão 0,0001g (0,1 mg), utilizada para mensurar a massa vegetal necessária durante a extração.

Figura 14: Balança analítica de precisão 0,1 mg.



Fonte: Foto do autor.

4.2.3. Analisador de umidade por infravermelho

Modelo IV2500, GEHAKA. Equipamento utilizado para aferir a umidade encontrada na massa de amostras vegetais.

Figura 15: Medidor de umidade por infravermelho.



Fonte: Foto do autor.

4.2.4. Centrífuga

Aparelho utilizado por 10 minutos para separar o óleo essencial do hidrolato e água após o processo de hidrodestilação. Modelo 206, FANEM.

Figura 16: Centrífuga.



Fonte: Foto do autor.

4.2.5. Ampolas de vidro âmbar

Utilizadas para o armazenamento do óleo essencial, de volume 5 mL. Foram seladas com maçarico levadas a refrigeração a 5 – 10 °C.

Figura 17: Ampolas de vidro âmbar contendo óleo essencial (a esquerda) e aberta (a direita).



Fonte: Foto do autor.

4.2.6. Sistema em conjunto de cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas

O óleo essencial de *Hyptis dilatata* B. foi analisado por um CG-EM no Laboratório de Farmacognosia na Universidade Federal do Maranhão com as seguintes especificações:

Tabela 1. Especificações do sistema em conjunto CG-EM utilizado na análise de composição do óleo de *Hyptis dilatata* B.

Sistema em Conjunto	
Instrumento	SHIMADZU QP 2010
Cromatógrafo a Gás	
Auto-injetor	AOC-20i
Coluna Capilar	Sílica Rtx-5MS (Restek, EUA) Comprimento: 30m Diâmetro Interno: 0,25mm Espessura do filme revestimento: 0,25µm
Espectrômetro de Massas	
Fonte de Ionização	Impacto Eletrônico
Bibliotecas de dados	NIST (<i>National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA, 2011</i>) ADAMS (<i>Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, 804p., 2007</i>) FFNSC 2 (<i>Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds: Mass Spectral Database, 2ª Edition, John Wiley & Sons Inc, 2011</i>)

4.3. Metodologia experimental

4.3.1. Identificação botânica

Uma parte de material vegetal colhido pela equipe foi separada para o preparo de excidatas e foram enviadas para o Museu Paraense Emilio Goeldi, em Belém (PA). O espécime foi identificado como *Hyptis dilatata* Benth.

4.3.2. Extração por hidrodestilação

O material vegetal foi retirado do ambiente de secagem e então separado entre as folhas e ramos saudáveis para ser levado à extração do material vegetal infectado por fungos ou devorado por insetos.

A massa de amostra vegetal foi levada à balança analítica e seu peso foi anotado para posterior cálculo de rendimento. Durante a extração 2 gramas de material foram levados ao analisador de umidade por infravermelho e submetidos a uma temperatura de 115°C por 30 minutos com taxa de secagem de 0,01%/min para que fosse possível aferir a umidade durante o intervalo de tempo enquanto ocorria a extração de óleo da amostra, garantindo que o valor de umidade obtido não venha a se alterar das condições em que a extração de óleo essencial teve início.

Após a pesagem da planta, esta foi levada ao sistema de hidrodestilação, emergindo-se a massa vegetal em uma quantidade razoável de água destilada em um balão de fundo redondo e levado à uma manta aquecedora apropriada. Após o início da ebulição os vapores de água arrastam o óleo essencial, sendo conduzidos pelo extrator de Clevenger e chegando ao condensador onde esse vapores são resfriados por uma solução hidroalcolica 1:1 de água/etanol 70°GL sob temperaturas abaixo de 10°C, resfriada pelo banho ultratermostático. Os vapores liquefeitos de água e óleo retornam ao extrator de Clevenger, e separando-os decorrência a sua mutua imiscibilidade e suas diferentes densidades, onde permanece até o fim da extração. O processo se estendeu por 3 horas nas quais o fluxo de vapor permanece constante (MAIA et al., 2009).

Após o fim da extração, o óleo essencial é retirado do extrator de Clevenger e coletado em um tubo de ensaio graduado. Então, ao óleo foi adicionado uma pequena quantidade de Na₂SO₄ anidro e posto para centrifugar por 10 minutos sob rotações de 2500 a 3000 rpm. Com esse último procedimento visou-se a completa separação do óleo da água a fim de evitar com futuros testes com o óleo fosse comprometidos por essa variante.

Ao fim da centrifugação o óleo foi pipetado para uma ampola de vidro âmbar e a ampola foi selada com o auxílio de um maçarico, evitando oxidação dos constituintes do óleo devido a exposição prolongada ao ar. Então, o óleo foi armazenado em ambiente refrigerado a 5 – 10 °C, evitando a degradação de seus componentes por exposição à luz e calor (GUIMARÃES et al., 2008), onde ficaram depositados até a realização de novos testes.

4.3.3. Cálculo do rendimento

O rendimento de um óleo essencial expressa a quantidade de óleo obtido em relação a quantidade de material vegetal utilizado na extração. Para determinação desse parâmetro, informações importantes são necessárias tais como: umidade relativa da planta durante a extração, massa vegetal utilizada para extração de óleo, volume de óleo obtido livre de água e a densidade do óleo.

O rendimento é uma razão direta entre o volume do óleo ($V_{\text{óleo}}$) e a massa da base livre de umidade (BLU). De acordo com a Equação 1 descrita a seguir é possível obter esse valor através de relações matemáticas com BLU, descrita na Equação 2:

$$\eta = \frac{v_{\text{óleo}}}{BLU} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

η = Rendimento do óleo essencial (v/m);

$v_{\text{óleo}}$ = Volume do óleo (mL);

BLU = Base Livre de Umidade (g).

$$BLU = m - (m \times \%_{\text{Umidade}}) \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

m = Massa do material vegetal utilizada na extração (g);

$\%_{\text{umidade}}$ = Umidade encontrada na amostra (%).

Ao substituir a Equação 2 na Equação 1 obtém-se:

$$\eta = \frac{v_{\text{óleo}}}{m - (m \times \%_{\text{umidade}})} \quad \text{Equação 3}$$

O valor do rendimento é expresso pela razão do volume de óleo obtido na extração e a massa vegetal utilizada na mesma. Contudo, caso se deseja o valor do rendimento expresso em unidades iguais (m/m), o rendimento deve ser multiplicado pela massa específica do óleo essencial ($\rho_{\text{óleo}}$), encontrando-se a massa da seguinte maneira:

$$\eta = \frac{v_{\text{óleo}} \times \rho_{\text{óleo}}}{m - (m \times \%_{\text{umidade}})} \quad \text{Equação 4}$$

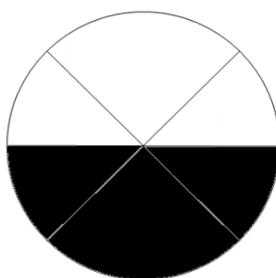
4.3.4. Densidade

Para a determinação da densidade utilizou-se um picnômetro de 1.0 mL previamente limpo e seco. Este foi pesado e tarado na balança analítica e, então, foi preenchido com 1 mL de óleo essencial de *Hyptis dilatata* B. O valor de massa observado corresponde a massa de óleo presente em um volume de 1 mL, uma proporção massa/volume que representa a densidade do óleo essencial.

4.3.5. Índice de Refração

Para a determinação do índice de refração o refratômetro foi ajustado a temperatura ambiente de 25°C. Foram fechados os prismas de Flint que compõem o instrumento e realizada a leitura pela escala do aparelho. Após os ajustes foi verificada uma configuração semelhante a representada na Figura 18, onde o óleo encontra-se no cruzamento do “X”. A leitura foi feita em escala a partir dessa condição.

Figura 18. Ilustração do óleo essencial observado no refratômetro.



Fonte: Criado pelo autor.

4.3.6. Caracterização química e quantificação de componentes

O óleo de *Hyptis dilatata* B. foi enviado ao Laboratório de Farmacognosia da UFMA e foi analisado em um sistema conjunto CG-EM. O equipamento utilizado foi um sistema Shimadzu QP 2010 ultraequipado com coluna capilar de sílica Rtx-5MS (Restek, EUA) de 30m de comprimento e 0,25mm de diâmetro interno revestido com filme de 5%-difenil/95%-

dimetil-polisiloxano de 0,25µm de espessura, utilizando Hélio como gás de arraste a um fluxo de 1mL/min. O sistema de injeção é por auto-injetor AOC-20i com injeção de 1 mL. A temperatura do forno do CG foi programada de 60°C a 240°C a 3°C/min, a do injetor (split 1:20) e da linha de transferência foi de 250°C e a da câmara de ionização, 200°C. Os espectros de massas foram obtidos por impacto eletrônico a 70 eV com scans automáticos na faixa massas de 35 a 400m/z a 0,30 scans/s.

A identificação dos componentes foi baseada no tempo e índice de retenção linear (série de n-alcanos C₈-C₂₀), na interpretação e comparação dos espectros de massas obtidos com as bibliotecas Adams 2007, Nist 2011 e FFNSC 2.

4.3.7. Atividade antimicrobiana

O óleo essencial de *Hyptis dilatata* B. foi enviado ao Laboratório de Microbiologia Clínica (LABMIC) no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFMA junto com outros óleos coletados em 2014 para a realização da avaliação da atividade antimicrobiana. A atividade foi testada in vitro através de dois bioensaios. Inicialmente por difusão em ágar e depois pela macrodiluição. Ambos os protocolos descritos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013).

4.3.7.1. Seleção de cepas bacterianas e fúngicas

Para realização dos testes foram utilizados microrganismos padrão ATCC (*American Type Culture Collection*) e isolados clínicos (IC). As amostras foram:

Candida albicans (ATCC 90028) / (IC)

Candida glabrata (IC)

Candida parapsilosis (IC)

Enterococcus faecalis (ATCC 29212)

Escherichia coli (ATCC 25922)

4.3.7.2. Preparo das suspensões microbianas

Os microrganismos foram reativados a partir de suas culturas originais e mantidos em meio líquido BHI (*Brain Heart Infusion*) a 37°C por 24 horas. Posteriormente, as amostras

serão cultivadas em placas de Ágar Nutriente a 37°C por 24 horas. As colônias isoladas foram então ressuspensas em 3 mL de solução fisiológica (NaCl 0.9 %) estéril até atingir uma turbidez equivalente na escala 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

4.3.7.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi feita através da técnica de microdiluição segundo a metodologia da diluição em caldo proposta pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standard* (2013). Para isto, as colônias foram ressuspensas em solução fisiológica (0,9 %) até atingir uma turbidez equivalente 0,5 na escala de McFarland, as placas de 96 poços estéreis foram preparadas com 50µL de caldo BHI e 50µL do óleo essencial seguido de diluições seriadas. Os tubos foram homogeneizados e levados à estufa a 35°C por 24 horas. Após o período de incubação foi adicionado 20µL do revelador resazurina a 0,01%. A CIM será a menor concentração da solução onde não houve crescimento bacteriano ou fúngico visível.

4.3.7.4. Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Foram utilizadas as placas incubadas para determinação da CIM em meio líquido para determinação da CBM e CFM. Uma alíquota (1 mL) de cada tubo foi inoculada em placas de Ágar Müeller Hinton e posteriormente incubadas em ambiente à 35°C por 24 horas. A CBM e CFM serão consideradas para a menor concentração da solução onde não houve crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado (99,9% de morte microbiana).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação botânica das exsicatas

A identificação botânica foi realizada por análises de semelhança feita com a exsicata enviada ao MPEG. Estas foram consideradas suficientes para a identificação botânica da espécie *Hyptis dilatata* Benth.

Figura 19: Exsicata da *Hyptis dilatata* Benth.



Fonte: Programa Re flora. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <<http://reflora.jbrj.gov.br>>.

5.2. Rendimento e características físico-químicas

O óleo essencial extraído das folhas de *Hyptis dilatata* B. apresentou rendimento de 4,85%. Esse valor simboliza é uma relação volume/massa que representa, matematicamente, a quantidade em mililitros de óleo presentes em 100 gramas de amostra vegetal sem umidade.

O rendimento expresso em relação massa/massa resultou em 4,11%. Este valor é significativamente maior que o expresso por outra espécie do Estado de Roraima, onde apresentou 0,5% de rendimento (MORAES, NASCIMENTO & OLIVEIRA, 2014)

A Tabela 2 mostra as características físico-químicas apresentadas pelo óleo volátil das folhas de *Hyptis dilatata* B.

Tabela 2. Características físico-químicas do óleo essencial extraído das folhas de *Hyptis dilatata* B.

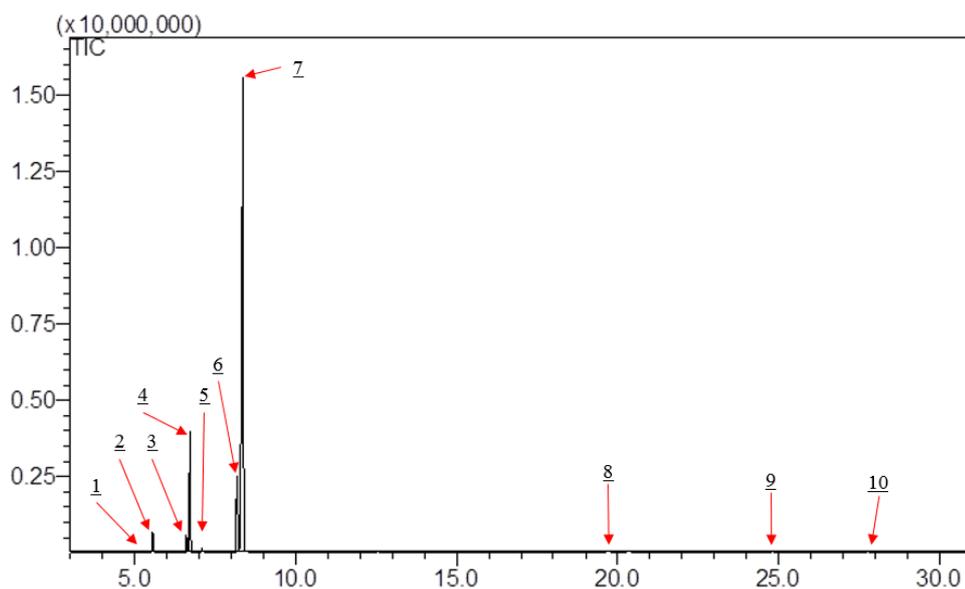
Características físico-químicas	Óleo essencial
Umidade (%)	13,83
Densidade (g/mL)	0,847
Índice de refração	1,469

Fonte: Dados do autor.

5.3. Identificação e quantificação dos constituintes do óleo essencial de *Hyptis dilatata* Benth

Através da análise por CG-EM foi possível identificar 10 constituintes, correspondendo a 98,45% da composição total do óleo. Entre os constituintes temos o limoneno (72,00%) como composto majoritário seguido de β -pineno (11,31%) e p-cimeno (10,19%). O cromatograma do óleo essencial extraído das folhas da espécie *Hyptis dilatata* B. é mostrado na Figura 20.

A composição completa do óleo, com seus devidos tempos de retenção, teor percentual, índices de retenção calculados e índices de retenção encontrados na biblioteca estão listados na Tabela 3.

Figura 20: Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Hyptis dilatata* B.

Fonte: Dados do autor.

Tabela 3. Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Hyptis dilatata* B.

Pico	TR ^a	Constituinte	Teor (%)	IRC ^b	IRB ^c
1	5.375	α -tujeno	0,17	926	924
2	5.550	α -pineno	1,67	933	932
3	6.600	Sabineno	1,60	973	969
4	6.715	β-pineno	11,31	977	974
5	7.080	Mirceno	0,61	991	988
6	8.175	p-Cimeno	10,19	1025	1022
7	8.365	Limoneno	72,00	1030	1024
8	19.755	Acetato de mirtenil	0,39	1314	1326
9	24.810	α -trans-Bergamoteno	0,28	1436	1432
10	27.780	β -bisaboleno	0,23	1509	1505
Total			98,45		

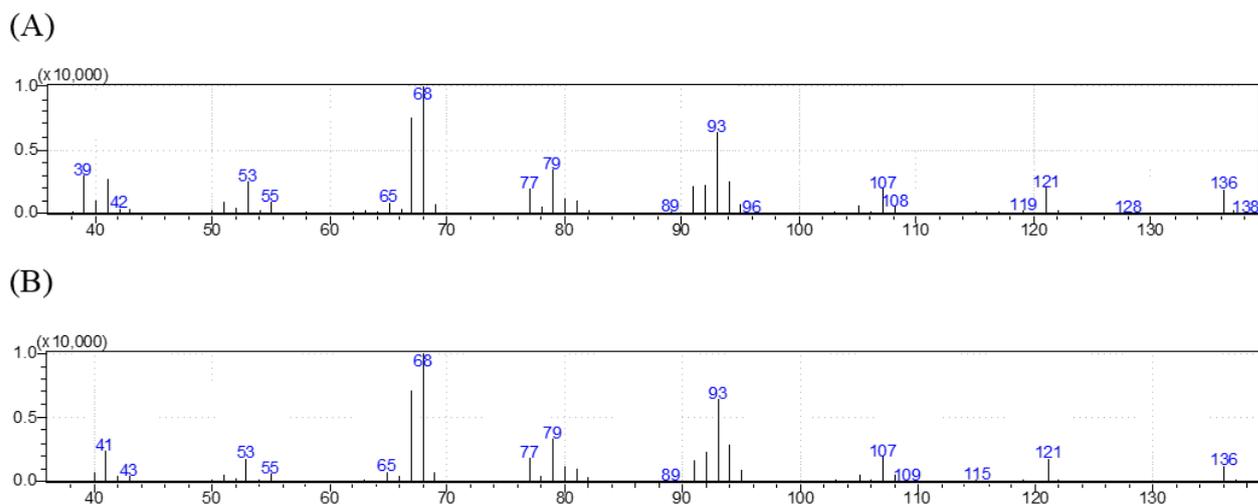
^aTempo de retenção na coluna cromatográfica

^bÍndice de Retenção Calculado

^cÍndice de Retenção da Biblioteca (ADAMS, 2007; FFNSC 2, 2011; NIST, 2011.)

Fonte: Dados do autor.

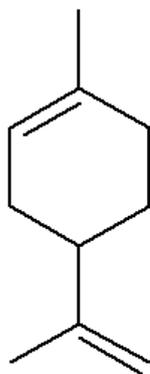
Os espectros de massa do limoneno, β -pineno e p-cimeno presentes no óleo essencial das folhas de *Hyptis dilatata* B. foram comparados com os espectros de massa fornecidos pela biblioteca e por semelhança entre os picos possível aferir a presença de cada um desses componentes na amostra.

Figura 21. Espectro de massas do limoneno

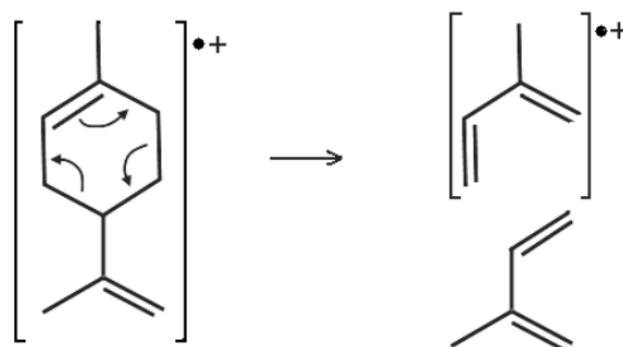
Fonte: Dados do autor

A Figura 21 (A) mostra a presença do pico do íon molecular $m/z = 136$, confirmando a presença de um hidrocarboneto $C_{10}H_{16}$, a fórmula do limoneno. Comparando os picos presentes na amostra com os fornecidos pela espectroteca FFNSC 2 na Figura 21 (B), e por dados constantes na literatura, confirma-se a semelhança de fragmentação desse monoterpreno (ADAMS, 2007).

O pico $m/z = 121$ [M-15] é decorrente da perda de um grupo metila. Já a aparição do pico $m/z = 68$ caracteriza a presença do fragmento $[C_5H_8]^+$ decorrente da quebra de ligações carbono-carbono semelhante à reação retro-Diels-Alder, comum em alquenos cíclicos (RIBEIRO, 2009). A Figura 23 ilustra a fragmentação do limoneno por reação de retro-Diels-Alder.

Figura 22. Fórmula estrutural do limoneno.

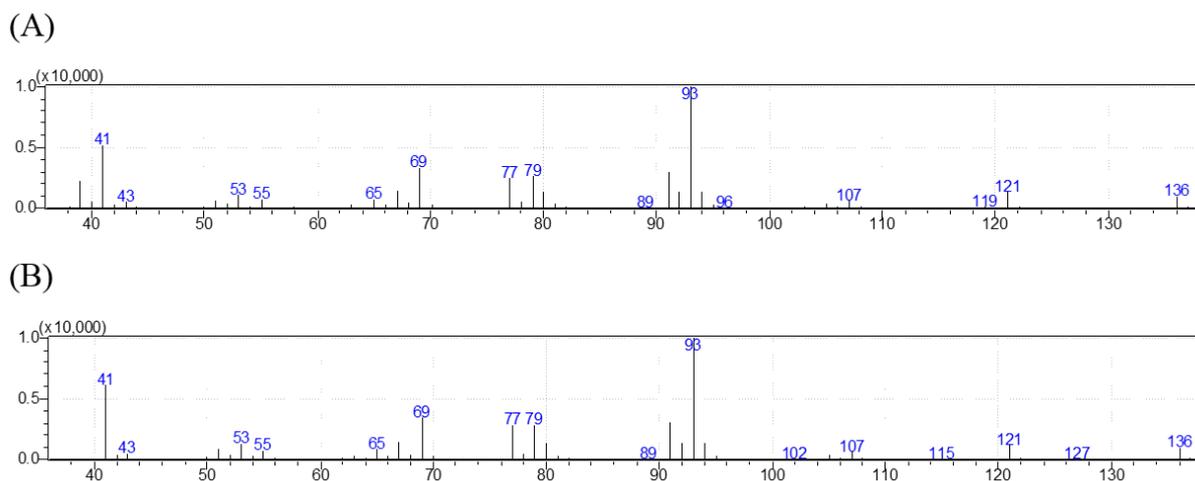
Fonte: Criado pelo autor (ChemSketch).

Figura 23. Fragmentação do limoneno por reação de retro-Diels-Alder.

Fonte: Reproduzido pelo autor (RIBEIRO, 2009. p. 53).

O espectro de massas do β -pineno no óleo (A) e a comparação com a espectroteca (ADAMS, 2007) (B) está representado na Figura 24.

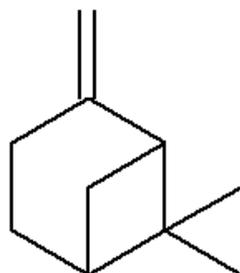
Figura 24. Espectro de massas do β -pineno.



Fonte: Dados do autor.

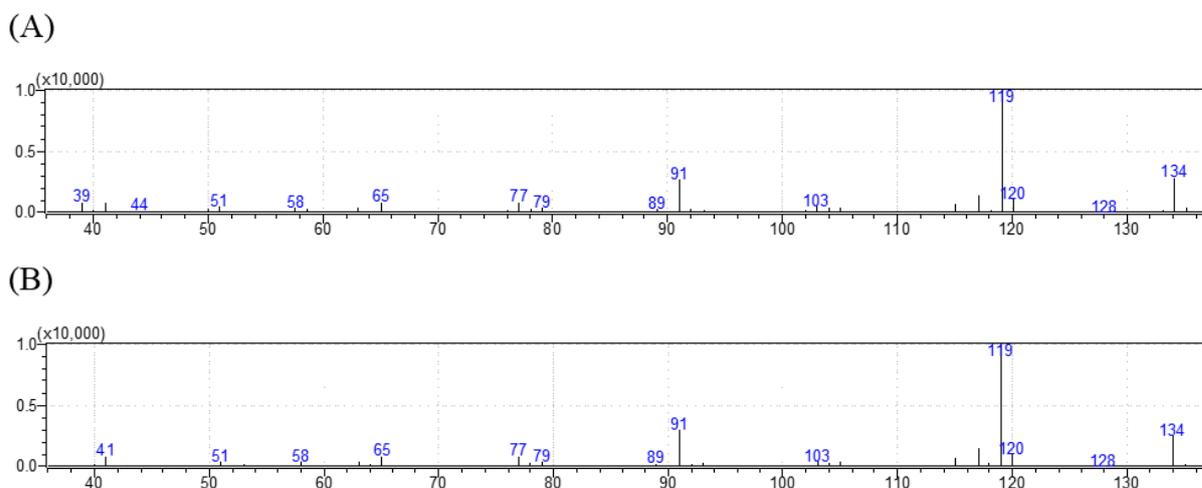
Esse monoterpreno apresenta pico do íon molecular $m/z = 136$ e também possui um pico em $m/z = 121$ [M-15] referente à perda de um grupo metil. O pico $m/z = 107$ ocorre devido à perda de um grupo metileno, seguido de uma nova perda e resultando no pico base $m/z = 93$, adquirindo uma configuração estável com $[C_7H_9]^+$ (RIBEIRO, 2009).

Figura 25. Fórmula estrutural do β -pineno.



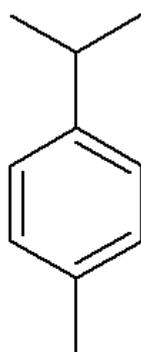
Fonte: Criado pelo autor (ChemSketch).

Os espectros de massa (Figura 26) do p-cimeno na amostra (A) foram comparados com a espectroteca FFNSC 2 (B), onde apresenta pico do íon molecular $m/z = 134$, confirmando a fórmula $C_{10}H_{14}$ (ADAMS, 2007).

Figura 26. Espectro de massas do p-cimeno

Fonte: Dados do autor

O pico base com $m/z = 119$ [M-15] é proveniente da perda de um grupo metila. Já os picos com $m/z = 91$ caracteriza a presença do íon tropílio $[C_7H_7]^+$ enquanto o pico $m/z = 65$ evidencia a presença do íon $[C_5H_5]^+$, resultante da eliminação neutra de acetileno $[C_2H_2]$ (MONTEIRO, 2008).

Figura 27. Fórmula estrutural do p-cimeno

Fonte: Criado pelo autor (ChemSketch)

5.4. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial

O óleo essencial das folhas de *Hyptis dilatata* B. apresentou atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli* (ATCC 25922) com CIM e CBM de 65,5 $\mu\text{L/mL}$ e frente ao *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) com CIM e CBM de 125 $\mu\text{L/mL}$.

Quanto a atividade antifúngica o óleo expressou atividade contra os fungos *Candida albicans* (IC) e *Candida glabrata* (IC) com CIM e CFM de 250 µL/mL enquanto para os microrganismos *Candida albicans* (ATCC 90028) e *Candida parapsilosis* (IC) somente apresentou CIM de 250 µl/mL.

A Tabela 4 demonstra as concentrações inibitórias, bactericidas e fungicidas mínimas expressas pelo o óleo frente aos diferentes microrganismos.

Tabela 4. Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de *Hyptis dilatata* B.

Microrganismo	CIM (µL/ml)	CBM/CFM (µL/mL)
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	65,5	65,5
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	125	125
<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	250	---
<i>C. albicans</i> (IC)	250	250
<i>C. glabrata</i> (IC)	250	250
<i>C. parapsilosis</i> (IC)	250	---

6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados pelo estudo da espécie *Hyptis dilatata* Benth permitem concluir que o óleo extraído das folhas da planta apresentaram rendimento de 4,85%, um valor relativamente alto se comparado ao óleo da mesma espécie coletada no estado de Roraima, com rendimento de 0,5%. O óleo gerado foi de alta qualidade e livre de impurezas.

A análise da composição química do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas forneceu dados suficientes para permitir o estudo de um novo quimiotipo de *Hyptis dilatata* B., evidenciando o limoneno como o composto majoritário com teor de 72,00% em sua composição, seguido de β -pineno (11,31%) e p-cimeno (10,19%).

O óleo essencial de *Hyptis dilatata* B. também demonstrou uma forte ação bactericida frente ao *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, sendo suas CIM e CBM em concentrações diluídas de 65,5 μ L/mL e 125 μ L/mL, respectivamente. Quanto a sua ação antifúngica contra as cepas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*, o óleo apresentou moderada eficácia, onde a eliminação dos fungos somente ocorreu em concentrações elevadas de 250 μ L/mL. Houve apenas inibição do crescimento micelial para as espécies *C. albicans* e *C. glabrata*.

O presente estudo colabora para com a continuidade dos estudos químicos e biológicos da espécie *Hyptis dilatata* B, fornecendo resultados que visam a expansão do conhecimento acerca do óleo essencial de uma das espécies menos estudadas da família Lamiaceae.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL. 804p. 2007.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; ALBUQUERQUE, U. P. **Check-list of the Family Lamiaceae in Pernambuco, Brazil**. Braz. Arch. Biol. Technol. vol.45, n.3, p. 343, 2002.

ANDRADE, M. A; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; MALLET, A. C. T.; MACHADO, S. M. F. **Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana**. Revista Ciência Agronômica, v. 43, n. 2, p. 399-408, abr-jun, 2012.

AZAMBUJA, J. **Produção e extração de óleos essenciais em pequenas propriedades rurais**. Curitiba, 2012. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/44747/R%20%20E%20%20JULIANA%20AZAMBUJA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em 12 de maio 2018.

BAKKALI, F. et al. **Biological effects of essential oils**. Food and Chemical Toxicology, v. 46, n. 02, p. 446-475, 2008.

BAŞER, K. H. C.; BUCHBAUER, G.; *Handbook of Essential Oils: Science, technology and applications*. CRC Press, Taylor and Francis Group, LLC. Boca Raton, Londres e Nova York. 2010.

BRUM, T. F. **Metabólitos secundários, composição química e atividade antioxidante do óleo essencial e das folhas de *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2012.

BURT, S. **Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods**. International Journal of Food Microbiology, v. 94, n. 03, p. 223-253, 2004.

CARVALHO, N. C. C. **Estudo Químico e biológico do óleo essencial do alecrimdo-tabuleiro (*Lippia gracilis* Schum).** 90p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís. 2012.

CASTRO, J. A. M. **Avaliação sazonal, circadiana, antifúngica e antioxidante do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. (Alfavaca).** 73p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís. 2015.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos – 7ª Edição.** Editora da UNICAMP. p. 143-144. 1997.

CLSI. M100-S23: *Performace Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute.* Pennsylvania, USA, v. 33, n.1, p.1-199, jan. 2013. M100-S23.

FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. **Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*.** Rev. Bras. Farm., 84(3): 69-74, 2003.

FERNANDES, Y. M. L. **Banco de Dados de Óleos Essenciais de espécies vegetais do Cerrado maranhense: Composição Química.** 92p. Monografia (Graduação) – UFMA. São Luís, 2017. 92p.

GUIMARÃES, L. G. L.; CARDOSO, M G.; ZACARONI, L. M.; LIMA, R. K.; PIMENTEL, F. A.; MORAIS, A. R. **Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) STAPF).** Química Nova. v.31. n.6. p.1476-1480. 2008.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. **Plano operativo de prevenção e combate aos incêndios florestais do Parque Nacional das Nascentes do Rio Parnaíba.** 2007. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/phocadownload/prevfogo/planos_operativos/37-parque_nacional_nascentes_rio_parnaiba-pi.pdf>. Acesso em 12 de jun. 2018.

Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Programa Reflora**. Disponível em <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/geral/ExibeFiguraFSIUC/ExibeFiguraFSIUC.do?idFigura=1220096>>. Acesso em: 30 de jun. 2018.

JORGE, S. S. A. **Plantas Mediciniais: Coletânea de Saberes**. 2003. Disponível em: <<http://docplayer.com.br/2788147-Plantas-mediciniais-coletanea-de-saberes-schirlei-da-silva-alves-jorge.html>>. Acesso em: 29 de abr. 2018.

KOBA, K.; POUTOULI, P. W.; RAYNAUD, C.; SANDA, K.. **Antifungal Activity of Essential Oils from *Ocimum gratissimum* L. grown in Togo**. Journal of Scientific Research. ISSN: 2070-0237. 164 – 171. 2009.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G. **Família Lamiaceae: Importantes Óleos Essenciais com Ação Biológica e Antioxidante**. Revista Fitos Vol. 3 N°03. Setembro 2007.

MACHADO, B. F. M. T.; JUNIOR, A. F. **Óleos Essenciais: Aspectos Gerais e usos em Terapias Naturais**. v. 3, n. 2, p. 105-127, 201.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A. **Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils**. Quimica Nova. v.32. n. 3, p.595-622. 2009.

MAIA, J. T. L. S.; MARTINS, E. R.; COSTA, C. A.; FERRAZ, E. O. F.; ALVARENGA, I. C. A.; SOUZA JÚNIOR, I. T.; VALADARES, S. V. **Influência do cultivo em consórcio na produção de fitomassa e óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) e hortelã (*Mentha x villosa* Huds.)**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. v.11. n.2. p.137-140. 2009.

MALINOWSKI, L. R. L. **Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de folhas jovens de *Eucalyptus globulus* Labill. subespécie *biocostata* (Maiden et al.) J. B. Kirkpat., Myrtaceae**. 117p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2010.

MELO, J. L. M.; SILVA, J. K. R; **Bioprospecção da Atividade Antimicrobiana e Anticolinesterásica de Óleos Essenciais de espécies de *Hyptis* com ocorrência na**

Amazônia Oriental. RESUMOS DO XXIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPA - 2013: ISSN 2176-1213

MONTEIRO, O. S. **Caracterização do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl. e sua aplicação como atrativo de abelhas euglossina.** 148p. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2008.

MOUCHREK FILHO, V. E. **Estudos Analíticos e modificações químicas por metilação e acetilação do eugenol contido no óleo essencial extraído das folhas da espécie *Pimenta dioica* Lindl.** São Carlos. 124p. Tese (Doutorado) – IQSC, USP. 2000.

OLIVEIRA, L. C.; MORAES, C. M. M.; NASCIMENTO, F. C. **Estudo Comparativo do Óleo Essencial de *Hyptis dilatata* (Benth) do Estado de Roraima com a mesma espécie coletada no Estado do Maranhão.** I Encontro De Química Do Norte – SBQNORTE 2014.

PETERSEN, R. Z. **Biotransformação de terpenóides por culturas de células vegetais e fungos filamentosos.** p. 217. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2006.

PRINS, C. L.; VIEIRA, I. J. C.; FREITAS, S. P. ***Growth regulators and essential oil production.* Brazilian Society of plant physiology.** v.22. n.2. p.91-102. 2010.

RAGGI, L. **Teor, composição química e atividade biológica de óleos voláteis de *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski e *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. (Asteraceae).** 147p. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo. 2013.

RIBEIRO, E. C. G. **Atividade moluscicida de óleos essenciais de plantas aromáticas da região amazônica maranhense.** 91p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís. 2016.

RIBEIRO, J. D. **Estudo Analítico e Avaliação da Atividade Antibacteriana do óleo essencial da espécie *Pimenta dioica* Lindl.** 93p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2009.

SANTOS, S.; MORAES, M. L. L.; REZENDE, M.O.O.; SOUZA FILHO, A.P.S. **Potencial alelopático e identificação de compostos secundários em extratos de calopogônio (*Calopogonium mucunoides*) utilizando eletroforese capilar.** Ecl. Quím., São Paulo, 36. 2011.

SINGH, G. et al. **A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents.** Food and Chemical Toxicology, v. 45, n. 09, p. 1650-1661, 2007.

SOUZA, M. S. **Aplicações da Espectrometria de Massas e da Cromatografia Líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular.** p. 162. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal – 3ª Edição.** Artmed. Cap. 13, p.309-332. 2006.

TRAJANO, V. N.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; TRAVASSOS, A. E. R. **Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 29(3): 542-545, jul.-set. 2009 p.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. **Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância.** Embrapa Clima Temperado, Documentos, 316. Pelotas, 2010. 16p.