

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ADONIAS DE OLIVEIRA TEIXEIRA

**Identificação e Quantificação de Voláteis de *Lippia thymoides* por CG-  
EM E CG-DIC Utilizando Fatores de Respostas Previstos**

Jequié - BA

Junho 2018

ADONIAS DE OLIVEIRA TEIXEIRA

**Identificação e Quantificação de Voláteis de *Lippia thymoides* por CG-EM E CG-DIC Utilizando Fatores de Respostas Previstos**

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

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Valfredo de Azevedo Lemos

Jequié - BA

Junho 2018

T266i Teixeira, Adonias de Oliveira.

Identificação e qualificação de voláteis de *Lippia thymoides* por CG-EM e CG-DIC utilizando fatores de respostas previstos / Adonias de Oliveira Teixeira-Jequié, 2018.

39f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação do Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira e coorientação do Prof. Dr. Valfredo de Azevedo Lemos)



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB  
Recredenciada pelo Decreto Estadual Nº 9.996, de 02.05.2006  
Programa de Pós-Graduação em Química



## Adonias de Oliveira Teixeira

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 16/06/2018.

Comissão Examinadora:

---

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

---

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

---

Prof. Dr. Clayton Queiroz Alves  
(UFBA, Salvador-BA, 2012)

---

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



## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço ao meu DEUS, por ser o autor e alicerce de minha vida, o amor incondicional e suporte de todos os meus dias, pois sem a presença dEle não iria a lugar algum, não daria nem um passo, a menos que tenha certeza de que Ele está comigo.

A minha amada família, Elisabete (Mãe), Isaque (Pai) e Adonay (Irmão), que sempre estão comigo me guiando e amando. Agradeço por cada momento, conselho, abraço, beijo e carinho que vocês tenham me concedido, pois é pelas forças e orações de vocês que não desistirei da minha caminhada e dedico cada suor, palavra, lágrima e sorrisos que me fizeram concluir esse curso.

A todos os familiares que desejaram o meu sucesso.

Agradeço a todos meus amigos e colegas, por me proporcionarem felicidade, companheirismo e amizade, pois quem encontrou um amigo, encontrou um tesouro.

Todo grupo de pesquisa do laboratório de óleos essenciais, pela amizade, companheirismo e por me ajudarem sempre que precisei. A todos os professores que contribuíram para minha formação.

Agradeço a Romário por disponibilizar um pouco de seu tempo para me ajudar nos meus testes biológicos. A Rafael Pereira por me ajudar nas minhas análises.

A Prof<sup>a</sup> Dra. Rosane Moura Aguiar por ter me ajudado nas horas de desespero e por ter paciência comigo.

Aos meus queridos orientadores Prof. Dr. Djalma e Prof. Dr. Valfredo, pela orientação, pela amizade, incentivo e paciência, contribuindo muito para o meu crescimento profissional, tornando possível a realização desta pesquisa.

Ao programa de pós-graduação em química da UESB-Jequié pela oportunidade de formação de Mestre em química e oportunidade desenvolver minha pesquisa.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

A todos esses e outros que não foram citados, muito obrigado!

*“Se não existe vida fora da Terra, então o universo é um grande desperdício de espaço”*

**(Carl Sagan)**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Foto da exsicata de <i>L. Thymoides</i> .....	16
<b>Figura2.</b> Estrutura química do nerol .....	18
<b>Figura 3.</b> Cromatograma do óleo essencial da da <i>Lippia Thymoides</i> , a) tempo de 8 a 15min; b) tempo de 15 a 25 min.; c) Tempo de 25 a 40 min.....	21
<b>Figura 4.</b> Espectros de massas dos constituintes principais, a) o-Cimeno; b) $\gamma$ -Terpineno c) Timol metil éter e d) $\beta$ -Cariofileno. ....	23
<b>Figura 5.</b> Constituintes identificados e quantificados no óleo essencial da <i>Lippia Thymoides</i> . .....	25

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Constituintes do óleo essencial identificados e quantificados com seus respectivos RRF previstos.....	27
<b>Tabela 2.</b> Testes biológicos com o óleo essencial da <i>Lippia Thymoides</i> .....	31



## **LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS**

**P.I** - Padrão Interno;

**CG-EM** - Cromatografia Gasosa Acoplada À Espectrometria De Massas;

**CG-DIC** - Cromatografia Gasosa Com Detector Por Ionização De Chama;

**RRF** - Relative Response Factor (Fator De Resposta Relativa)

**IR**- Índice De Retenção

**PDA** - Potato Glucose Agar

## **Identificação e Quantificação de Voláteis de *Lippia thymoides* por CG-EM E CG-DIC Utilizando Fatores de Respostas Previstos**

Autor: Adonias de Oliveira Teixeira

Orientador: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos

### **RESUMO**

O uso de plantas para fins culinários e terapêuticos são tradições nas culturas de várias nações, sendo largamente utilizadas no tratamento e prevenção de doenças por vários povos e culturas de diversas maneiras. A *L. thymoides* é uma das plantas medicinais mais conhecidas desde a antiguidade, graças as suas propriedades medicinais, comestíveis e aromatizantes, apresentando uma grande variabilidade de compostos voláteis que possuem diversas atividades biológicas. Esta pesquisa trata do estudo químico da planta *L. thymoides*, testando também suas atividades biológicas frente aos fungos *Penicillium roquefortii*, *Rhizopus microsporus var. oligosporus*, *Aspergillus niger*. A identificação dos componentes do óleo essencial da *L. thymoides*, foi realizada por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), onde para as quantificações dos constituintes foram analisadas por meio da cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (CG-DIC). Foram identificados e quantificados 27 compostos, sendo os constituintes principais *o*-Cimeno (29,70 %), seguido do Timol metil éter (9,50 %),  $\gamma$ -Terpineno (6,30 %), e o  $\beta$ -Cariofileno (6,00 %). Para quantificação foi utilizada a técnica de padronização interna utilizando os fatores de resposta relativa previstos (RRF). O óleo essencial da *L. thymoides* com massa na faixa de 8,7 mg. mL<sup>-1</sup>, apresentou atividade fungicida, inibindo o crescimento dos fungos *Penicillium roquefortii* INCQS 40075 (ATCC 4845), *Rhizopus microsporus var. oligosporus*, *Aspergillus niger* INCQS 40018 (ATCC 1004).

**Palavras-chave:** *Lippia thymoides*, terpenos, fator de resposta relativa, quantificação.

# Identification and Quantification of *Lippia thymoides* Volatiles by GC-MS and CG-DIC Using Predicted Response Factors

Author: Adonias de Oliveira Teixeira

Advisor: Dr. Djalma Menezes de Oliveira

Co-supervisor: Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos

## ABSTRACT

The use of plants for culinary and therapeutic purposes are traditions in the cultures of various nations and are widely used in the treatment and prevention of diseases by various peoples and cultures in various ways. *L. thymoides* is one of the medicinal plants best known since ancient times, thanks to its medicinal, edible and flavoring properties, presenting a great variability of volatile compounds that have diverse biological activities. This research deals with the chemical study of the plant *L. thymoides*, also testing its biological activities against the fungi *Penicillium roquefortii*, *Rhizopus microsporus var. oligosporus*, *Aspergillus niger*. The identification of the essential oil components of *L. thymoides* was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), where quantification of the constituents was analyzed by gas chromatography with flame ionization detector (CG-DIC). Twenty-seven compounds were identified and quantified, with the main constituents *o*-Cymene (29.70%), followed by Thymol methyl ether (9.50%),  $\gamma$ -Terpinene (6.30%) and  $\beta$ -Caryophyllene (6, 00%). For quantification, the internal standardization technique was used using predicted relative response factors (RRF). The essential oil of *L. thymoides* with mass in the range of 8.7 mg. mL<sup>-1</sup>, showed fungicidal activity, inhibiting the growth of fungi *Penicillium roquefortii* INCQS 40075 (ATCC 4845), *Rhizopus microsporus var. oligosporus*, *Aspergillus niger* INCQS 40018 (ATCC 1004).

**Keywords:** *Lippia thymoides*, terpenes, relative response factor, quantification.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. MATERIAIS E MÉTODO .....	15
2.1 Obtenção do óleo essencial .....	15
2.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.....	16
2.3 Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama .....	17
2.4 Quantificação dos constituintes.....	17
2.5 Avaliação preliminar de atividade antifúngica.....	19
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
3.1 Análises dos cromatogramas, identificação e quantificação dos constituintes.....	20
3.2 Avaliação preliminar de atividade antifúngica.....	29
4. CONCLUSÃO .....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	33

# Identificação e Quantificação de Voláteis de *Lippia thymoides* por CG-EM E CG-DIC Utilizando Fatores de Respostas Previstos

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas para fins culinários e terapêuticos são tradições nas culturas de várias nações, constituindo ainda hoje um recurso alternativo de grande aceitação (Santos *et al.* 2008). Plantas medicinais são largamente utilizadas no tratamento e prevenção de doenças por vários povos e culturas de diversas maneiras (Sales, Sartor & Lima 2016).

Entre essas plantas medicinais destacam-se as espécies da Família Verbenaceae, pertencente à ordem Lamiales. Esta Família compreende 35 gêneros e 1.035 espécies. Os gêneros mais representativos em número de espécies são: *Verbena*, *Lippia*, *Citharexylum*, *Stachytarpheta*, *Glandularia* e *Duranta* (Gomes, Nogueira & Moraes 2011; Souza & Lorenzi 2012). Na região neotropical ocorrem 32 gêneros e 480 espécies, sendo o Brasil o país que apresenta a maior riqueza de táxons de Verbenaceae com 16 gêneros e 290 espécies (Costa *et al.* 2017).

A *L. thymoides* (Alecrim do campo) é uma planta aromática da família Verbenaceae, natural no Hemisfério Sul e em algumas regiões tropicais da América do Norte e Austrália (Reis *et al.* 2014). Também conhecida pelos nomes populares, alecrim-do-cerrado, alecrim-do-campo, alecrim-de-cheiro, sendo bastante empregada no banho para o tratamento de feridas, as folhas são utilizadas como antipiréticas, no tratamento da bronquite e reumatismo (Silva 2012; May *et al.* 2010).

*L. thymoides* é uma das plantas medicinais mais conhecidas desde a antiguidade, graças as suas propriedades medicinais, comestíveis e aromatizantes, é bastante utilizada para fins culinários e médicos (Achour *et al.* 2018; Oliveira *et al.* 2017; Ribeiro *et al.* 2012). Apresentando propriedades antioxidantes e antimicrobianas (Sirocchi *et al.* 2017; Oliveira *et al.* 2017; Sales, Sartor & Lima 2016), estimulantes, antiespasmódica, emenagogas, cicatrizantes (May *et al.* 2010), inapetência, carditônico, anti-séptico, anti-tumoral, anti-depressivo natural, vasodilatador (Ribeiro *et al.* 2014; Carvalho 2004; Ribeiro *et al.* 2012).

*L. thymoides* é um arbusto de 0,5 a 1,5 m de altura, ramos lisos e quadrangulares. Folhas opostas nos ramos normais, fasciculadas nos braquiblastos, discolores, coriáceas, 0,5 a 1 cm de comprimento; Flores pediceladas, pedicelo com 0,3 a 0,4 cm de comprimento e de aromas forte e agradável. (Lorenzi & Matos 2006). *L. thymoides* é facilmente distinguível das demais espécies congêneres encontradas na área de estudo pelas folhas verticiladas de lâmina oblanceolada com venação hifódroma e flores de cálice cilíndrico (Melo *et al.* 2010).

Segundo Santos (2015, p. 19) espécies do gênero *Lippia* apresentam uma grande variabilidade de compostos voláteis que possuem diversas atividades biológicas (Santos, 2015), onde a composição química do extrato varia, devido a alguns fatores que influenciam diretamente na qualidade, quantidade de óleo e extrato produzido. Dependendo do continente onde o alecrim é cultivado, do método de extração utilizado, do método de análise, da parte da planta (folha ou caule) e do preparo da matéria prima (se *in natura* ou seca) para obtenção de seus extratos, podemos encontrar composições variadas (Carvalho Junior, 2004).

Os terpenos ou seus derivados são constituintes majoritários em óleos essenciais de plantas, onde, se constituem como um extenso grupo de moléculas orgânicas produzidas como metabólitos secundários, principalmente em plantas para evitar ataques promovidos por agentes externos (Felipe & Bicas, 2017). Terpenos podem ser encontrados também em organismos marinhos, algas, microrganismos e em menor extensão em fungos (Fehlberg, 2011; De Martino *et al.* 2015).

Quimicamente, os terpenos podem ser definidos como “alcenos naturais”, isto é, apresentam uma dupla ligação carbono-carbono sendo caracterizado como um hidrocarboneto insaturado (Mc Murry, 2011). Apresentam uma grande diversidade estrutural derivada da junção cabeça-cauda de unidades de cinco átomos de carbonos chamadas de unidades isoprênicas. As estruturas químicas formadas através da junção de duas, três, quatro, seis e oito unidades isoprênicas, originando os monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40), dentre outras classificações de acordo com a quantidade de carbonos na molécula e/ou unidades de isopreno presentes (Fehlberg, 2011; Menezes *et al.* 2017).

Os triterpenos têm despertado grande interesse por parte dos pesquisadores devido a seu amplo espectro de atividade biológica, tais como anti-inflamatória, antibacteriana,

antifúngica, antiviral, antitumoral, antidiabética, antiulcerogênica, anticariogênica, hepatoprotetora, neuroprotetora, antiparasítica, analgésica e antioxidante (Coloma *et al.* 2011).

Através de estudos anteriores foi evidenciado que as atividades biológicas presentes principalmente em vegetais odoríferos, estão diretamente atreladas à composição química de seus óleos essenciais que trazem como constituintes majoritários desse gênero: o timol, carvacrol, carvona, limoneno, *p*-cimeno, geranial, linalol, mirceno,  $\gamma$ -terpineno,  $\beta$ -cariofileno e óxido de cariofileno (Costa *et al.* 2017; Sirocchi *et al.* 2017; Linde *et al.* 2016). Assim como os terpenos também é evidenciado um padrão na presença de ácidos fenólicos e fenilpropanoides, como por exemplo anetol, eugenol e o aldeído cinâmico. Essas classes de metabólitos secundários pertencem a um dos grupos mais numerosos e largamente distribuídos de substâncias das plantas, que são os compostos fenólicos ou polifenóis, sendo provenientes das vias biossintéticas do chiquimato e acetato (Silva 2012).

Silva (2012) investigou o perfil fitoquímico e farmacológico da *L. thymoides*, correlacionando com o uso popular. Os óleos essenciais foram obtidos nas quatro estações climatológica, tiveram como constituinte majoritário o sesquiterpeno  $\beta$ -cariofileno. Segundo a pesquisa, a espécie *L. thymoides* apresentou potente atividade antioxidante no ensaio de sequestro do radical DPPH, provavelmente devido ao alto teor de constituintes fenólicos. Os óleos essenciais inibiram o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus*, enquanto que as frações diclorometano e acetato de etila dos extratos metanólicos das folhas e caules inibiram o crescimento de *S. aureus*, *Micrococcus luteus* e *Bacillus cereus* (Silva 2012).

Quantificar e identificar os constituintes químicos em um óleo essencial, se tornou cada vez uma tarefa importante, pois, são as proporções destes que determinam as atividades organolépticas de alimentos, em indústria de aromas e fragrância antes da importação e exportação do material, análises de plantas para fins medicinais, etc. (Tissot *et al.* 2011).

Quando o objetivo da análise é a determinação de um ou alguns constituintes da amostra, a adição de um padrão interno pode auxiliar na correção de erros analíticos. A técnica consiste na preparação das soluções padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse, às quais se adiciona a mesma quantidade conhecida de um

composto chamado padrão interno. Ele é usado como marcador interno para compensar todos os efeitos que podem alterar a área do pico, incluindo as flutuações do volume da amostra injetado (Ciola 1985 ; Bottoli *et al.* 2004; Fernandes *et al.* 2003; Tissot *et al.* 2012).

Idealmente, a substância usada como padrão interno deve ser similar à substância a ser quantificada, ter tempo de retenção próximo a esta substância, não reagir com a substância ou outro componente da matriz, não fazer parte da amostra e, quando cromatografada, ficar separada de todas as demais substâncias presentes na amostra (Fernandes *et al.* 2003). A Cromatografia Gasosa é uma técnica para separação e análise de misturas de substâncias voláteis. A amostra é vaporizada e introduzida em um fluxo de um gás adequado denominado de fase móvel ou gás de arraste. Este fluxo de gás com a amostra vaporizada passa por um tubo contendo a fase estacionária, onde ocorre a separação da mistura. A fase estacionária pode ser um sólido adsorvente ou, mais comumente, um filme de um líquido pouco volátil, suportado sobre um sólido inerte ou sobre a própria parede do tubo (Cromatografia Gasosa de Alta Resolução). (Atkins & Jones 2001; Mühlen & Lanças 2004).

Esta pesquisa teve como objetivo a identificação e quantificação dos constituintes químicos do óleo essencial das folhas de uma espécie *L. thymoides*, utilizando CG-EM e CG-DIC. Bem como avaliar a atividade antifúngica do óleo frente à *Penicillium roquefortii* INCQS 40075 (ATCC 4845), *Rhizopus microsporus var. oligosporus*, *Aspergillus niger* INCQS 40018 (ATCC 1004).

## **2. MATERIAIS E MÉTODO**

### **2.1 Obtenção do óleo essencial**

As folhas de *L. thymoides* foram coletadas no dia 07 de Junho de 2017, no município de Maracás – Bahia, cerca de 88 km de distância do município de Jequié. Região caracterizada por ser uma zona de transição entre a caatinga e cerrado, e possui considerável variedade vegetativa. Uma exsiccata representativa (Figura 1) foi depositada no herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, sob o registro



HUESB 12093. Família: Verbenaceae. Gênero: *Lippia* Espécie: *Thymoides*. O Óleo essencial foi extraído e doado por Torres (2017), onde este foi armazenado sob refrigeração até o presente momento para o estudo quantitativo e qualitativo.

**Figura 1.** Foto da exsicata de *L. thymoides*.



Fonte: Torres 2017

## 2.2 Identificação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

As análises dos OE's foram realizadas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas Shimadzu modelo QP2010, contendo uma coluna de baixa polaridade SLB5MS (30 m x 0,32 mm diâmetro interno e 0,32 µm de espessura do filme) e carreador de gás hélio com fluxo de 1,80 mL/min, o injetor e o detector estavam á 220 °C. A temperatura inicial da coluna foi programada de 40 °C/ 2 min. chegando a 240 °C / 5min.a 3 °C/min, modo de injeção Split 1:20, fluxo de purga 3,0 mL/min, pressão 22.2 kPa.

A identificação dos constituintes dos OE's foi realizada com base nos índices de retenção comparados aos obtidos do padrão de hidrocarboneto (C4 - C26), injetados sob

as mesmas condições cromatográficas e no padrão de fragmentação dos espectros de massas, sendo ambos comparados aos encontrados na biblioteca NIST (2014) e Silva 2012.

### **2.3 Quantificação por cromatografia gasosa com detector por Ionização de Chama (GC-FID)**

A quantificação dos componentes do óleo essencial da *L. thymoides* foi realizada por meio da cromatografia gasosa, utilizando equipamento Varian, modelo CP 3800, com detector de ionização de chama (GC-FID), com coluna capilar DBS 0,25mm de diâmetro interno, 30 m de comprimento e 25 µm de filme líquido THK. Amostras de óleo essencial da *L. thymoides* foram pesadas em balança analítica de precisão e diluídas em 1 mL de solvente (Tolueno). Após preparadas, 1µL foi injetado em razão de split1:10, com temperatura inicial: 40°C/ 2min., Rampa de Aquecimento: 3°C.min<sup>-1</sup>, Temperatura final: 240°C/ 5 min. . A vazão de gás de arraste (Nitrogênio) foi de 3 mL.min<sup>-1</sup>, e temperatura de injetor de 220°C, a temperatura de interface de 240° C, a pressão na coluna de 14 psi. Gás de make up: ar sintético, nitrogênio e hidrogênio.

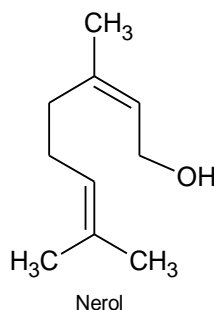
### **2.4 Quantificação dos constituintes**

Para o preparo das soluções, foi pesado 40,8 mg da amostra de óleo essencial e 1,0 mg do padrão interno (Nerol) em balança analítica e diluída em até 1000 µL do solvente Tolueno. Foi injetado o volume de 1 µL desta solução sob as mesmas condições de análise relatadas.

A quantificação foi realizada através de cálculos feitos em uma planilha no excel com base no trabalho de Cachet *et al.* 2016, utilizando os fator de resposta relativa (RRFs) previstos de cada constituinte contido no óleo, realizando assim uma padronização interna, que é um método frequentemente utilizado para quantificação de constituintes em óleo essencial. (Tissot *et al.* 2012). A quantificação é realizada com base na comparações entre os sinais do padrão interno, externo ou adição padrão (quantidades conhecidas) com dos analitos presentes, onde através deste método é possível determinar o nível destes presente no óleo (IOFI 2011). O nerol foi utilizado para a padronização

interna (figura 2), sendo este ausente na amostra, mas possuindo características similares com os constituintes no óleo essencial da *L. thymoides*.

**Figura 2.** Estrutura química do nerol.



O óleo é injetado juntamente com o padrão interno, onde suas respostas são corrigidas utilizando o RRF previsto, sendo este calculado a partir da fórmula molecular e número de anéis benzênicos contidos em cada analito (Cachet *et al.* 2016).

Os fatores de respostas (RRF's) previstos são obtidos pela equação a seguir, na forma simplificada, ideal para amostras de óleos (Tissot *et al.* 2012):

$$\text{RRF}_i = 10^3 (\text{MW}_i / \text{MW}_{\text{PI}}) (-61,5 + 88,8n_C + 18,7n_H - 41,3n_O + 3,8n_S - 20,2n_F - 23,5n_{\text{Cl}} - 10,2n_{\text{Br}} - 1,07n_I + 121n_{\text{BENZ}})^{-1}$$

### Equação 1

Onde  $n_C$ ,  $n_H$ ,  $n_O$ ,  $n_S$ ,  $n_F$ ,  $n_{\text{Cl}}$ ,  $n_{\text{Br}}$ ,  $n_I$ , representam números de átomos de carbono, hidrogênio, oxigênio, enxofre, fluor, cloro, bromo e iodo respectivamente no composto;  $n_{\text{Benz}}$  é o número de anéis de benzeno, e  $\text{MW}_i$  e  $\text{MW}_{\text{PI}}$  são as massas moleculares do analito e o padrão interno, respectivamente. A Equação 1 é derivada das entalpias de combustão dos compostos, considerando que o detector por ionização por chama (DIC ou FID em inglês) opera por combustão e as entalpias de combustão dos compostos detectados apresentaram, segundo a literatura, excelente correlação linear com os fatores de respostas para este detector (Saint Laumer, J-Y. *et al.*, 2010).

Quando adiciona-se um padrão interno em uma amostra real, a quantificação é obtida pela equação:

$$m_1 = (a_1 \times m_p \times \text{RRF}) / A_p$$

### **Equação 2**

Onde  $m_1$  e  $A_1$ : massa a ser quantificada do constituinte e área deste, respectivamente;  $A_p$  e  $m_p$ = área e massa do padrão interno, respectivamente; RRF: Fator de resposta relativa previstos dos constituintes.

Também foram calculadas as quantificações sem a utilização do RRF, sendo este calculado pela equação:

$$m_1 = (a_1 \times m_p) / A_p$$

### **Equação 3**

Sendo este para comprovação da eficiência deste método. Onde  $m_1$  e  $A_1$ : massa a ser quantificada do constituinte e área deste, respectivamente;  $A_p$  e  $m_p$ = área e massa do padrão interno, respectivamente.

## **2.5 Avaliação preliminar de atividade antifúngica**

Com auxílio de uma balança analítica (Shimadzu) pesou-se 4,32g de PDA (Potato Glucose Agar – Fluka), e preparou-se uma solução a 110 mL para o preparo do meio de cultura. As placas de petri utilizadas para os testes, foram autoclavadas juntamente com a solução de PDA a 121°C, durante 15 min, com uma pressão de 1 atm. Os meios de culturas foram confeccionados com 10 mL da solução em cada placa de petri em capela estéril de ultravioleta (UV).

Foram preparadas dez soluções a partir do óleo essencial das folhas de *Lippia Thymoides.*, com concentrações de 5 a 50  $\mu\text{L}$ , onde foram completados a 1 mL com clorofórmio  $\text{CHCl}_3$ . Confeccionou-se discos de papel filtro de 5 mm de diâmetro onde foram adicionados sobre as culturas e mantidos estéris a temperatura ambiente. Posteriormente adicionou-se 2 gotas das soluções preparadas do óleo sobre cada disco. Cada disco foi colocado sobre meio de cultivo apropriado, sendo adicionado uma pequena alíquota dos fungos ao lado dos discos. Foram realizadas triplicatas de cada solução durante cinco dias a 30° C em estufa bacteriológica, apropriada para o crescimento destes.

Para os ensaios de atividade antifúngica foram utilizados os seguintes fungos: *Penicillium roquefortii* INCQS 40075 (ATCC 4845), *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*, *Aspergillus niger* INCQS 40018 (ATCC 1004).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Análises dos cromatogramas, identificação e quantificação dos constituintes

Segundo Mühlen 2009, os índices de retenção mais utilizados são conhecidos como índices de Kovats (KI) e índices de retenção com programação linear de temperatura. O Índice de Kovats foi introduzido em 1958 para ser utilizado em separações isotérmicas, e pode ser calculado empregando-se a equação 1:

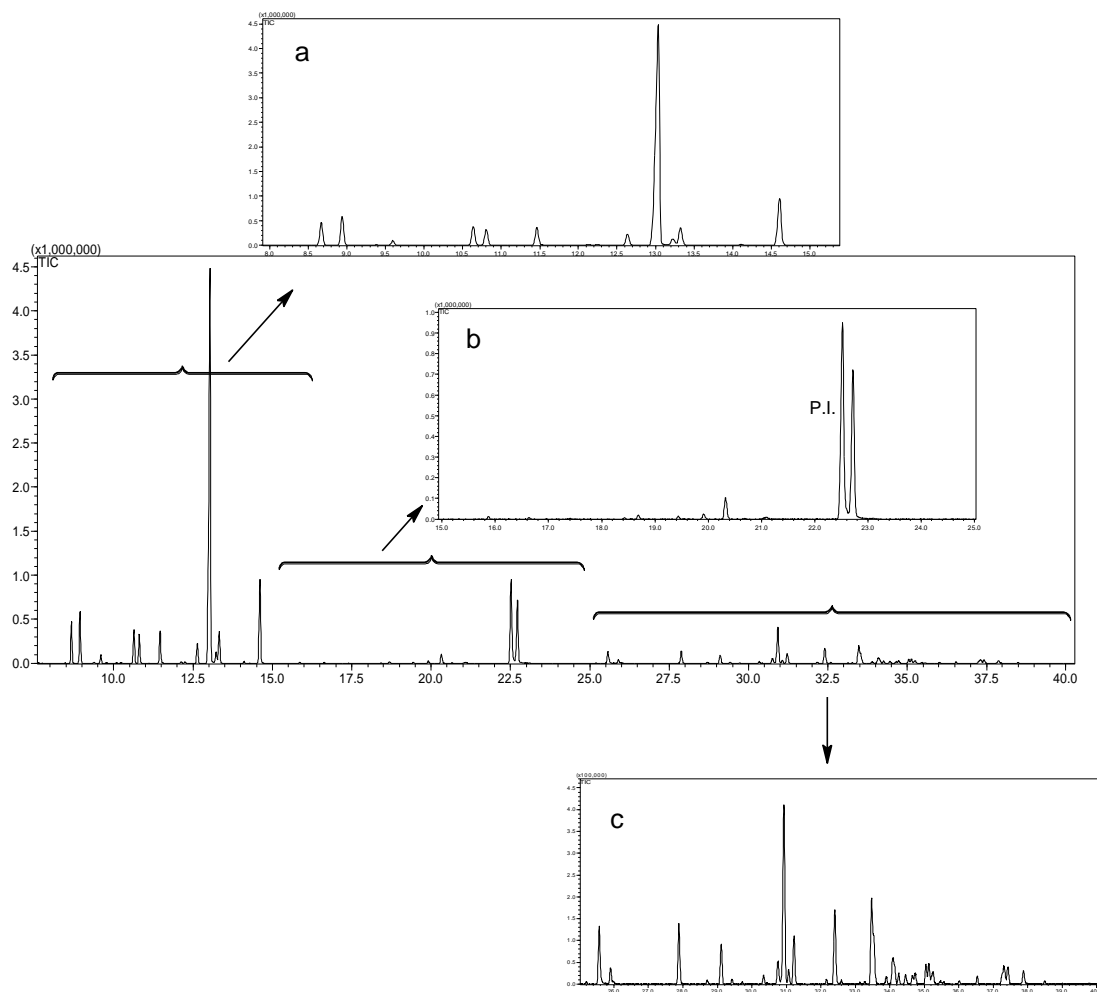
$$IRL = 100 \left[ \frac{t_c - t_n}{t_{n+1} - t_n} + n \right] \quad \text{Equação 4}$$

Onde: IRL - índice de retenção linear;  $t_c$  - tempo de retenção do composto de interesse;  $t_{n+1}$  - tempo de retenção do hidrocarboneto posterior;  $n$  - nº de carbonos do hidrocarboneto anterior.

O índice de retenção dos componentes é obtido por interpolação, onde será relacionado o tempo de retenção do analito em estudo com o tempo de retenção de dois padrões, geralmente hidrocarbonetos, eluídos um antes e um após o pico do analito de interesse (Incedy, Lengyel & Ure 1998). Durante a pesquisa foram realizadas temperaturas programadas, logo a formula utilizada foi extraída de seu algoritmo original, obtendo a equação 4.

Utilizando-se a técnica de GC-MS identificaram-se vários compostos citados na literatura (Costa *et al.* 2017; Sirocchi *et al.* 2017; Linde *et al.* 2016) como sendo componentes importantes contidos no óleo essencial do alecrim. Através das Figuras 3 e 4, foi possível observar o cromatograma, bem como os espectros de massas dos principais constituintes obtidos pela análise no GC-MS do OE da *L. thymoides*.

**Figura 3.** Cromatograma do óleo essencial da *L. thymoides*, a) tempo de 8 a 15min; b) tempo de 15 a 25 min.; c) tempo de 25 a 40 min.



O *o*-cimeno é o constituinte majoritário, esta molécula é comumente encontrada em diversos OE de variadas plantas, especialmente do gênero *Lippia*, no cromatograma observa-se em  $m/z = 134$  o íon molecular do *o*-cimeno, com destaque na  $m/z = 91$  correspondente ao íon tropilium e os fragmentos do anel aromático com  $m/z = 77$ , figura 4 (a).

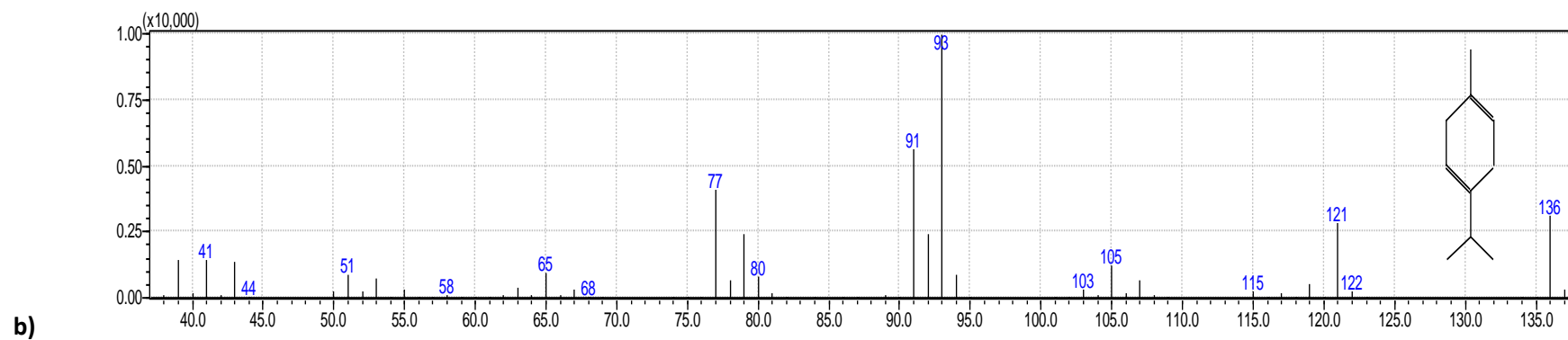
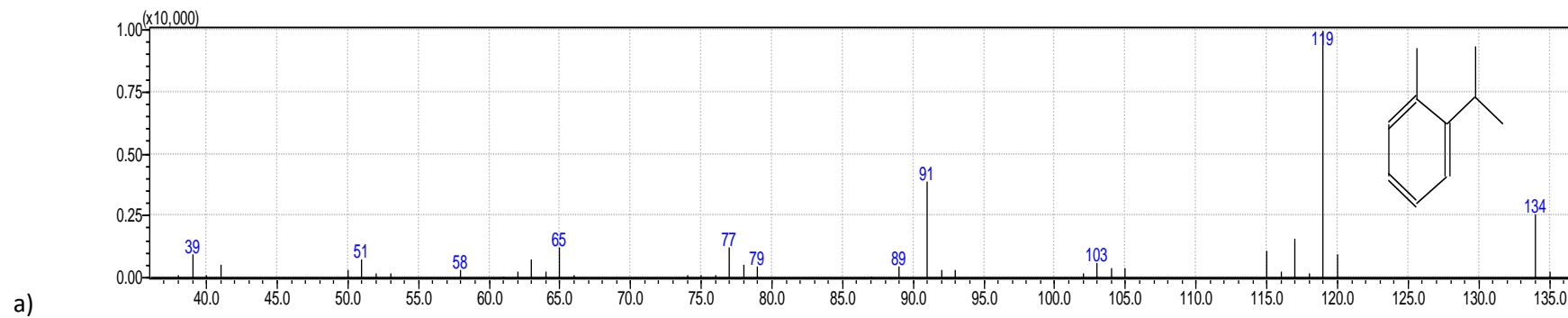
O  $\gamma$ -Terpineno é o segundo constituinte majoritário identificado no óleo da *L. thymoides*, sendo este também relatado na literatura como um dos constituintes encontrados em plantas esta espécie de *Lippia*, observando-se o íon molecular em  $m/z = 136$ , destacando o íon com  $m/z = 121$  correspondente a perda de uma metila ( $-\text{CH}_3$ ),  $m/z =$

93 correspondente perda do grupo isopropil (-CHCH<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>) e os fragmentos do anel aromático com  $m/z = 77$ , sendo observado na figura 4 (b).

Timol metil éter, foi o terceiro constituinte majoritário, pois este, é encontrado naturalmente em extratos de plantas cítricas e em óleos essenciais de plantas, é pertencente a classe dos fenilpropanóides (ESCOBAR, 2010). O Espectro de massa deste, apresenta um íon molecular com  $m/z = 164$ , sendo o pico base  $m/z = 149$ , correspondente a perda de uma metila (-CH<sub>3</sub>),  $m/z = 133$  correspondente a saída de uma metoxila (-OCH<sub>3</sub>), destacando também  $m/z = 91$  correspondente ao íon tropilium e os fragmentos do anel aromático com  $m/z = 77$ , figura 4 (c).

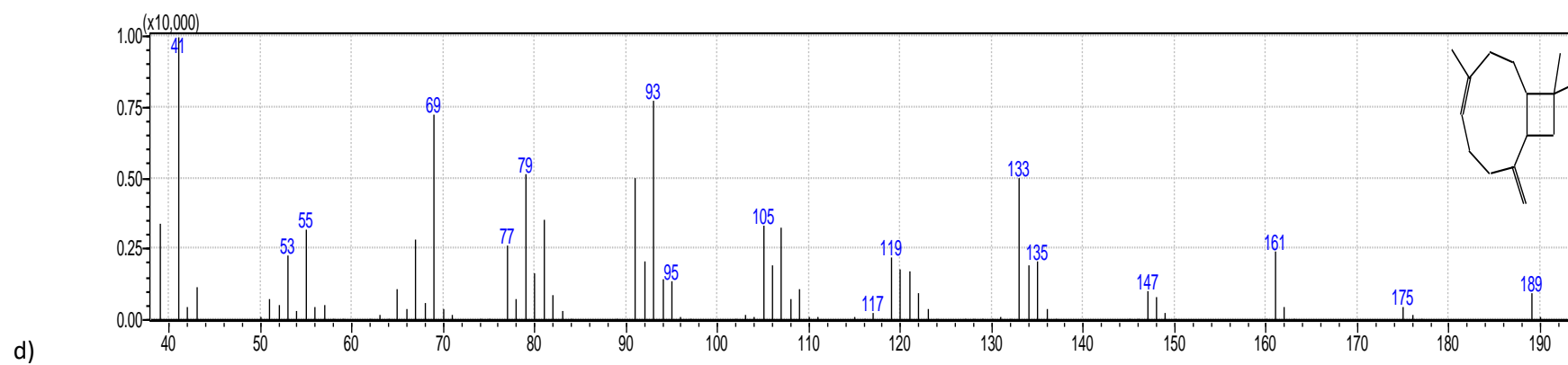
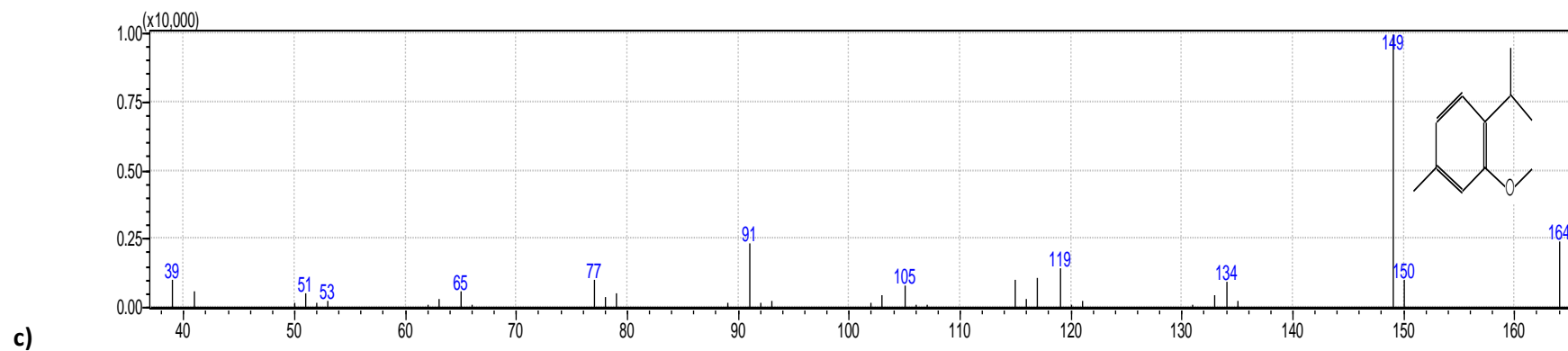
Para o  $\beta$ -Cariofileno foi apresentado um íon molecular com  $m/z = 189$ , perdendo os principais radicais (-CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) obtendo  $m/z = 56$ , fragmentando (-CHCH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>) obtendo o pico com  $m/z = 93$ , sendo observado também um pico com  $m/z = 91$  correspondente ao íon tropilium que pode ser formado durante a fragmentação, figura 4 (d). Este produto natural é um composto não esteroide que possui efeitos antiinflamatórios. Atua bloqueando a síntese de prostaglandinas inibindo a ciclooxigenase, que converte o ácido araquidônico em endoperóxidos cíclicos: os precursores das prostaglandinas. Como resultado, o trans-cariofileno tem ação analgésica, antipirética e inibitória de plaquetas (Abu-Shandia *et al.* 2015).

**Figura 4.** Espectros de massas dos constituintes principais, a) *o*-Cimeno; b)  $\gamma$ -Terpineno e c) Timol metil éter e d)  $\beta$ -Cariofileno





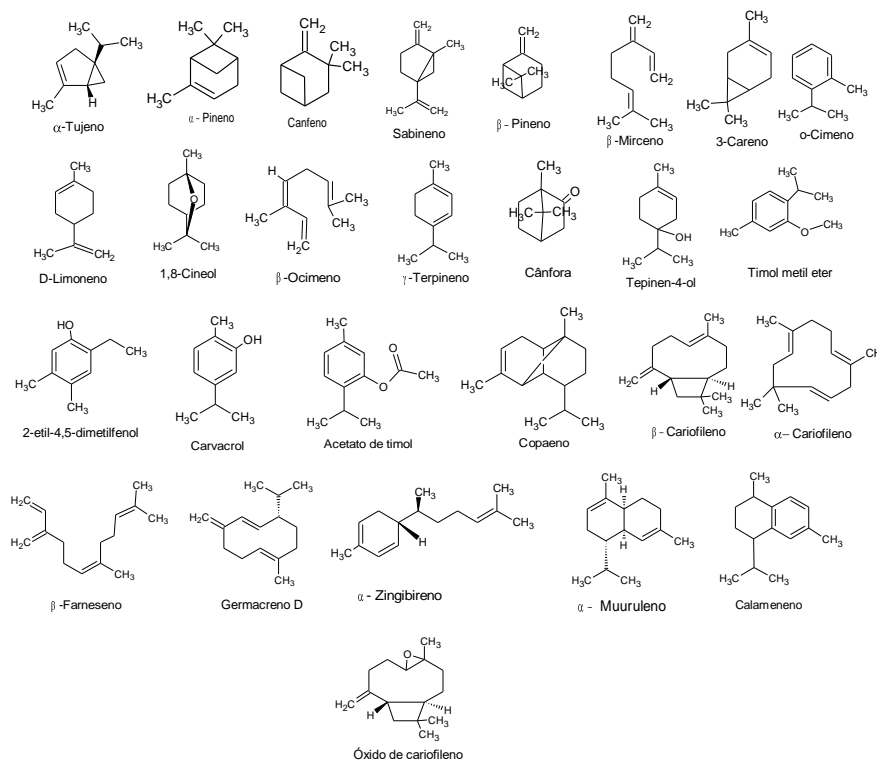
Continuação figura 4.



Segundo a pesquisa de Silva 2012, os óleos essenciais foram obtidos nas quatro estações climatológica. Logo, dentre todos os constituintes, foi observado a predominância do sesquiterpeno  $\beta$ -cariofileno como constituinte majoritário em todos os óleos, variando entre 17,22 % em no outono e 26,27 % no inverno. A pesquisa houve uma variação dos constituintes que apareceram em maior proporção em seguida ao  $\beta$  -cariofileno, esta variação foi observada de acordo com as estações do ano, sendo os constituintes canfeno (5,44%), cânfora (8,61 %), borneol (5,33%) e  $\alpha$ -cariofileno (5,05 %), representando assim 41,65 % do óleo das plantas coletadas no outono.

Comparado com os dados obtidos nesta pesquisa, pode-se observar uma diferença na quantidades de constituintes majoritários, constatando também diferença na sua identificação. A Tabela 1 e figura 5 é destacado os 27 compostos identificados usando-se o sistema CG-EM, onde mostraram que a maioria dos constituintes principais são monoterpenos, sendo os majoritários: *o*-Cimeno (29,70 %), seguido do Timol metil éter (9,50 %),  $\gamma$ -terpineno (6,30 %) e o  $\beta$ -Cariofileno (6,00 %) que é o sesquiterpeno, com confirmação pelo IR comparados pela literatura (Silva 2016) e fragmentação do espectro de massas, sendo que no outono no trabalho de Silva 2016 foram identificados 29 constituintes.

**Figura 5.** Constituintes identificados e quantificados no óleo essencial da *L. thymoides*.



Foi observado que no trabalho de Silva *et al.* (2016), comparando os dados químicos com as informações climatológicas, que houve uma tendência de *L. thymoides* em sintetizar sesquiterpenos, com destaque para o  $\beta$ -cariofileno, em períodos com baixas insolação e temperatura média e elevada umidade relativa do ar, como no inverno. Da mesma maneira, observa-se redução da síntese do  $\beta$ -cariofileno em períodos com alta insolação e baixa umidade relativa do ar, como no verão (Silva *et al.* 2016).

O que pode ser explicado a alta produção de *o*-cimeno e baixa produção  $\beta$ -cariofileno destacado nesta pesquisa, é o tipo de bioma onde ocorre a planta. Pode-se observar pelos resultados apresentados na tabela 1 que, a maioria dos valores dos índices de retenção dos constituintes estudados estão coerentes com os valores encontrados na literatura, de acordo com a polaridade da coluna cromatográfica.

Através da padronização interna e dos cálculos de fator de resposta relativa (RRF), foram feitas as quantificações de cada constituinte no óleo essencial, sendo esta etapa de grande importância para estudos químicos e farmacêuticos, pois através destes valores que são definidas concentrações ocorrem atividades.

É recomendado a utilização da técnica de quantificação por RRF, pois esta permite a quantificação de compostos voláteis de óleos essenciais, pela cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (CG-DIC) , sem a presença de compostos autênticos, e também em muitos casos pode evitar procedimentos de calibração demorados. Sendo este tipo de detecção mais robusto que os detectores por massa (GC-MS). As determinações de MS sem fatores de resposta exibiram uma falta de precisão e reprodutibilidade, como é abordado no trabalho de Cicchetti *et al.* 2008. Os fatores de resposta relativa (RRF) podem ser previstos a partir da fórmula molecular do composto, sendo aplicada também a compostos contendo os átomos C, H, O, N, S, F, Cl, Br, I e Si. , desde que a fórmula molecular e o número de anéis de benzeno nos analitos também sejam conhecidos (Cachet *et al.* 2016).

**Tabela 1.** Constituintes do óleo essencial identificados e quantificados com seus respectivos RRF previstos

Pico	Composto	FM	IR <sub>Lit</sub>	IR <sub>Calc</sub>	Área	% Área	RRF <sub>Cal</sub>	m(mg)*	m%*	m(mg)**	m%**
PI	Nerol (P.I)	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	1228	1221	1965381	1,20%	0,8913	1,00	1,50%	1,00	1,20%
1	$\alpha$ -Tujeno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	931	932	488776	1,80%	0,7846	1,16	1,80%	1,48	1,80%
2	$\alpha$ -Pineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	939	937	667004	2,50%	0,7846	1,61	2,40%	2,05	2,50%
3	Canfeno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	953	952	143305	0,60%	0,7846	0,37	0,60%	0,47	0,60%
4	Sabineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	975	977	613222	1,90%	0,7846	1,22	1,80%	1,55	1,90%
5	$\beta$ -Pineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	980	981	240595	1,50%	0,7846	0,99	1,50%	1,26	1,50%
6	$\beta$ -Mirceno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	991	997	453113	1,80%	0,7846	1,17	1,80%	1,49	1,80%
7	3-Careno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1011	1024	309981	1,50%	0,7846	0,97	1,50%	1,24	1,50%
8	o-Cimeno	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	1026	1024	7726517	30,50%	0,7846	19,55	29,70%	24,92	30,50%
9	D-Limoneno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1030	1029	148649,1	0,70%	0,7846	0,45	0,70%	0,57	0,70%
10	1,8-Cineol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	1033	1032	329216	1,90%	0,8914	1,38	2,10%	1,54	1,90%
11	$\beta$ -Ocimeno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1062	1069	68210	0,20%	0,7846	0,11	0,20%	0,14	0,20%
12	$\gamma$ -Terpineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1177	1181	1550348	6,50%	0,7846	4,15	6,30%	5,3	6,50%
13	Cânfora	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	1225	1224	48453	0,20%	0,9101	0,16	0,20%	0,17	0,20%
14	Terpinen-4-ol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	1338	1340	246811	1,10%	0,8914	0,81	1,20%	0,91	1,10%
15	Timol metil éter	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O	1418	1414	1972943	8,50%	0,9076	6,29	9,50%	6,93	8,50%
16	2-Etil-4,5-dimetilfenol	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	1454	1450	520836	2,60%	0,8295	1,76	2,70%	2,12	2,60%
17	Carvacrol	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O	1480	1476	205034	1,20%	0,8102	0,8	1,20%	0,99	1,20%
18	Acetato de timol	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	1350	1345	355057	2,10%	0,9248	1,62	2,50%	1,75	2,10%
19	Copaeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1376	1372	267288	1,80%	0,7705	1,11	1,70%	1,45	1,80%

Continuação da Tabela 1

20	$\beta$ -Cariofileno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1418	1414	1004956	6,20%	0,7705	3,93	6,00%	5,1	6,20%
21	$\beta$ -Farneseno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1456	1456	113834	0,60%	0,7705	0,4	0,60%	0,52	0,60%
22	$\alpha$ -Cariofileno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1454	1450	254409	1,90%	0,7705	1,17	1,80%	1,51	1,90%
23	Germacreno D	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1480	1476	453829	3,10%	0,7705	1,92	2,90%	2,49	3,10%
24	$\alpha$ -Zingibereno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1493	1491	200954	1,40%	0,7705	0,91	1,40%	1,18	1,40%
25	$\alpha$ -Muuroleno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1500	1500	91994	0,50%	0,7705	0,33	0,50%	0,43	0,50%
26	Calamelene	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>	1529	1519	47106	0,30%	0,7798	0,22	0,30%	0,28	0,30%
27	Óxido de cariofileno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	1582	1577	37519	0,30%	0,8512	0,19	0,30%	0,23	0,30%
<b>Não identificados</b>					3638969	15,06%	0,8081	6,59	16,5%	8,15601	16,4%
<b>Soma das Massas encontradas</b>					24164309	100,0%		40,0	100,0%	49,8	100,0%
<b>Identificados</b>					20525340	84,94%	<b>OE (mg) =</b>	<b>40,8</b>	83,5%		
<b>Recuperação global (%)</b>								98%		122%	
<b>Erro</b>								-2%		22%	

Legenda: PI: Padrão interno; (\*) Quantificação utilizando o RRF; (\*\*) Quantificação com RRF = 1; IRteor: Índices de retenção teórico; IRcalc.: Índices de retenção calculado; Massa de OE de L. Thymoides pesada foi de 40,8 mg; RRFmédio = 0,8081 (não identificados).

Para realizar a quantificação dos constituintes utilizando os fatores de respostas relativa previsto, geralmente é necessário a utilização de um padrão específico para cada constituinte do óleo essencial, mas óleos essenciais ha uma grande variedade de constituintes, onde para a determinação experimental de todos os fatores de resposta, o método torna-se extremamente tedioso, demorado e com alto custo. Além disso, nem sempre todos os padrões estão disponíveis em laboratórios analíticos e comercialmente. Logo, através desta pesquisa utilizou-se a padronização interna para a quantificação dos constituintes, onde com o valor da área do padrão interno pode-se realizar a quantificação dos constituintes, utilizando também os RRFs calculados, que são feitos com a Equação 1.

Através da tabela 1 podemos observar que os valores das quantificações realizada utilizando o RRF calculados obteve-se valores mais confiáveis, sendo observado pela porcentagem do erro obtido da quantificação sem a utilização do RRF (erro = 22%), com o valor obtido com a utilização do RRF (erro = -2%), comprovando assim eficiência do método utilizado, onde pode ser observado também pelos valores das recuperações. No trabalho de Tossi *et al* 2012 é relatado que a utilização de um padrão interno quando adicionado à mistura, e as quantidades constituintes são determinadas assumindo que todos os fatores de resposta relativos a este padrão interno são iguais a 1 ou sem a utilização deste, provou ser muito imprecisa, com vieses de até mais de 40%, comparado com os valores dos RRFs previstos.

O padrão interno apesar de ser semelhante aos encontrados no óleo, ele é um terpeno oxidado, ou seja, aumentaria a confiança dos resultados obtidos com a utilização de um padrão interno mais similar aos compostos do óleo, sendo que houve a presença de oito compostos que a similaridade se aproximaram do padrão interno, ocorrendo assim um pequeno erro nos resultados obtidos, gerado pelo o efeito de matriz ocorrido, sendo também que este pode ter acontecido pelo elevado valor na massa utilizada do padrão interno, causando assim o erro de -2%.

### **3.2 Avaliação preliminar de atividade antifúngica**

O desenvolvimento e a inibição de microrganismos foram avaliados segundo método modificado de Tomazoni *et al.* 2016, em diferentes concentrações de óleo

essencial utilizando meio de ágar batata-dextrose (PDA). As concentrações do óleo essencial foram de 5 a 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de solvente (clorofórmio). A incubação foram realizadas em estufa bacteriológica, (apropriada para o crescimento destes), em um período de 5 dias a 30°C, sendo para cada fungo, foram realizadas triplicadas de cada concentração preparada.

Na pesquisa de Oliveira *et al.* 2017 o foram testados extratos da *Lippia.*, atuando em biofilmes monomicrobianos de *C. albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* e *P. aeruginosa*, atuando também como em biofilmes polimicrobianos formados por *C. albicans* com cada bactéria. Em relação às linhagens celulares, o extrato promoveu viabilidade celular acima de 50% ( $\leq 50 \text{ mg} / \text{mL}$ ). Mostrou efeito antiinflamatório significativo, controlando a síntese de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  por RAW estimulado por LPS 264.7 (Oliveira *et al.* 2017). Outros estudos, também mostraram a eficiência da utilização de diferentes extratos de *Lippia*. Em alguns tipos de células tumorais como, câncer de próstata (Petiwala *et al.* 2014), pâncreas ( González-Valinas *et al.* 2014), carcinoma hepatocelular e câncer de ovário ( Wang, Li & Zu 2012).

Nos ensaios biológicos realizado por Silva 2012, constatou que os óleos essenciais da espécie *L. Thymoides* inibiram o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus*, apresentando também atividade antinociceptiva em camundongos, provavelmente pelo efeito anti-inflamatório do  $\beta$ -cariofileno, 1,8-cineol, canfeno e borneol. Atividade espasmolítica *in vitro* em órgãos isolados, com os óleos essenciais relaxando útero de rato e aorta de rato de maneira independente do endotélio (Silva 2012). A tabela 2, mostra os resultados dos testes antifúngicos envolvendo o OE contra três tipos de fungos. Observa-se que o produto a partir de uma concentração de 10  $\mu\text{L} / \text{mL}$  (correspondente a 8,7  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) já inibiu o crescimento de todos os tipos de fungos utilizados para os testes. Já em concentrações abaixo de 10  $\mu\text{L} / \text{mL}$ , os fungos mostraram resistência ao OE. Assim, na presente pesquisa, mostramos a atividade anti-fúngica do OE das folhas da *L. thymoides*, e seu efeito sobre o crescimento de três espécies de fungos.

Segundo a literatura alguns destes compostos apresentam interessantes atividades biológicas, como *o*-Cimeno,  $\gamma$ -Terpineno e o Timol metil eter possuem atividades antibacteriana e antifúngica (Bitu *et al.* 2012; Mendes *et al.* 2010; Sarrazin *et al.* 2012; Soto-Dominguez *et al.* 2012; Escobar *et al.* 2010; Sarrazin *et al.* 2015), o limoneno e germacreno D, possuem atividades antifúngicas, antibacteriana

(Olivero-Verbel *et al.* 2009; Escobar *et al.* 2010; Montanari *et al.* 2011) e funcionam como sinalizadores fundamentais no relacionamento de plantas e insetos (Souza *et al.* 2007),  $\beta$ -cariofileno possui ação anestésica, antibacteriana e antifúngica (Aguiar *et al.* 2008; Escobar *et al.* 2010; Souza *et al.* 2007), mirreno tem atividade analgésica e antifúngica (Sarrazin *et al.* 2012; Souza *et al.* 2007),  $\beta$ -pineno possuindo ação antiséptica e antimicrobiana (Souza *et al.* 2007). Constituintes que possuem atividades biológicas, são como precursores para sínteses destes e utilizados em fármacos (Costa *et al.* 2017).

**Tabela 2.** Testes biológicos com o óleo essencial da *L. thymoides*

Fungos	O.E (µL/mL)	
	5	10 a 50
<i>Penicillium roquefortii</i> INCQS 40075 (ATCC 4845).	-	+
<i>Rhizopus microsporus var. oligosporus.</i>	-	+
<i>Aspergillus niger</i> INCQS 40018 (ATCC 1004).	-	+

Legenda : + Ativo; - Inativo

É relatado no trabalho de Silva *et al.* (2016) que, outros trabalhos anteriores revisaram extensivamente a química da *Lippia* e descobriram que os componentes com maior frequência nos óleos essenciais desse gênero são o limoneno, o  $\beta$ -Cariofileno, o *p*-cimeno, a cânfora, o linalol, o  $\alpha$ -pineno e o timol. Sendo que o  $\beta$ -Cariofileno é o constiuinte majoritario nos óleos essenciais coletados em diferentes estações do ano, mas é relatado que este não seja o principal responsável pelas atividades antimicrobianas, pois todos os óleos essenciais é constituído por uma grande variedades de compostos que que influenciam em atividades biológicas (Silva *et al.* 2016), o que é evidenciado no atual trabalho, que mesmo com baixas concentrações de  $\beta$ -cariofileno, o óleo essencial conseguiu inibir o crescimento dos fungos estudados.

Outro ponto importante a ser considerado é a morfologia do microorganismo, pois segundo a literatura, terpenos (principalmente monoterpenos e sesquiterpenos) induzem alteração na membrana bacteriana, promovendo ruptura e aumentando a permeabilidade, levando a conclusão de que a estrutura da membrana desta influencia nas atividades biológicas, sendo explicado assim o efeito seletivo do óleo essencial da *L. thymoides* contra bactérias e fungos (Silva *et al.* 2016). Logo, é comprovado que estes constituintes majoritarios identificados através da pesquisa, possuem atividades biológicas



antifúngicas, como foi evidenciado pela inibição do crescimento dos fungos, onde os resultados demonstram que *L. Thymoides* é uma fonte de substâncias de interesse farmacêutico, comprovando parcialmente a utilização popular dessa espécie no tratamento de feridas, febre e reumatismo.

#### **4. CONCLUSÃO**

Com base nos dados apresentados, foi evidenciado que a espécie *Lippia Thymoides* é uma possível fonte de substâncias com diversas atividades biológicas, atestando seu uso na medicina. Foi comprovado a importância da padronização interna e dos cálculos de fator de resposta relativa (RRF), sendo essa uma ferramenta de quantificação rápida para misturas complexas e uma maneira de quantificar compostos, onde através desses foi possível corrigir os valores obtidos durante as análises e quantificar cada constituinte do óleo essencial.

Com base no potencial biológico, esta planta medicinal, conclui-se que esta tem grandes chances de ser um promissor agente terapêutico aplicado em algumas formulações, pois foi comprovada sua eficácia em diversas áreas de aplicação, como evidenciado nesse estudo que mostrou um alto poder na inibição do crescimento dos fungos *Penicillium roquefortii*, *Rhizopus microsporus var. oligosporus*, *Aspergillus niger*, utilizando soluções em pequenas concentrações do óleo da *Lippia Thymoides*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-SHANDIA ,K; AL-SOUFIB, H; SAWALQAA , M. A Quick GC/MS Method correlated with LC/MS/MS for the Identification of Medicinal Natural Products in *Convolvulus arvensis*: An Injury Healing Plant. Eurasian Juornal Chem 10(3): 137-149, 2015.

ACHOUR, M; MATEOS, R; FREDJ, M.B; MTIRAOU, A; BRAVO, L; SAGUEM, S. A Comprehensive Characterisation of Rosemary tea Obtained from *Rosmarinus officinalis* L. Collected in a sub-Humid Area of Tunisia. Phytochemical Analysis. Volume 29, Issue 1January/February 2018Pages 87–100.

AGUIAR, J. S; COSTA, M. C. C. D.; NASCIMENTO, S.C; SENA, K. X. F. R. Atividade antimicrobiana de *Lippi aalba* (Mill) N.E. Brown (Verbenaceae). Revista Brasileira Farmacognosia, pp. 436-440, 2008.

ATKINS, P; JONES, L. Princípios de Química: questionando a vida moderna e o meio ambiente. Porto Alegre, 2001. Editora Bookmam

BABUSHOK, V.I; ZENKEVICH, I.G; Retention Indices for Most Frequently Reported Essential Oil Compounds in GC. Chromatographia 2009, 69, February (No. 3/4)

BITU, V; BOTELHO, M.A; COSTA, J.G; RODRIGUES, F.F; VERAS, H.N; MARTINS, K.T. & SIQUEIRA, J.D.S. Phytochemical screening and antimicrobial activity of essential oil from *Lippiagracillis*. Brazilian Journal of Pharmacognosy, pp. 69-75, 2012.

BOTTOLI, C. B. G; COLLINS, C.H; JARDIM, I.C.S.F. Validação Em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. Quim. Nova, Vol. 27, No. 5, 771-780, 2004.

CACHET, T; BREVAR, H.; CHAINTREAU, A.; DEMYTTENAERE, J; FRENCH, L; GASSENMEIER, K; JOULAIN, D.; KOENIG, T; LEIJS, H; LIDDLE, P; LOESING, G; MARCHANT, M; MERLE, PH; SAITO, K; SCHIPPA, C; SEKIYA, F AND SMITH, T. IOFI recommended practice for the use of predicted relative-response factors for the rapid quantification of volatile flavouring compounds by GC-FID. Flavour Fragr. J. 2016.

CARVALHO JUNIOR, R. N. Obtenção de extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por extração supercrítica: determinação do rendimento global, de parâmetros cinéticos e de equilíbrio e outras variáveis do processo. 2004. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CIOLA, R. Fundamentos da cromatografia a gás. 2ª Edição revista e ampliada. 1985

COLOMA, A. G.; BALBOA, C. L.; REINA, O. S. M.; FRAGA, B. M. Triterpene-based plant defenses. *Phytochem Ver*, v. 10, p. 245-260, 2011.

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

DE MARTINO, L.; NAZZARO, F.; MANCINI, E.; DE FEO, V. In: PREEDY, V. R.; WATSON, R. R. (ed). 1º Ed. *Essential oils from Mediterranean Aromatic Plants. The Mediterranean Diet: An Evidence-Based Approach*. Londres: Elsevier, 2014. Chap. 58, p. 649-661.

E. CICCETTI, P. MERLE, A. CHAINTREAU. Quantitation in gas chromatography: usual practices and performances of a response factor database, *Flavour Fragr. J.* 23 (2008) 450–459.

ESCOBAR, P., LEAL, S.M., HERRERA, L.V., MARTINEZ, J.R., STASHENKO, E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp. essential oils and their major components. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, pp. 184-190, 2010.

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

FELIPE, L.O; BICAS, J.L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. *Quim. nova esc-São Paul-SP, BR.* Vol. 39, N° 2, p.120-130, MAIO 2017.

FERNANDES, K. G; MORAES, M; NETO, J.A.G; NÓBREGA, J.A; OLIVEIRA, P.V. Padronização Interna Em Espectrometria De Absorção Atômica. *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 2, 249-252, 2003

GOMES, S.V.F; NOGUEIRA, P.C.L; MORAES, V.R.S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. *Eclet. Quím.* vol.36 no.1 São Paulo 2011.

GONZÁLEZ-VALINAS M, MOLINA S, VICENTE G, ZARZA V, MARTÍN-HERNÁNDEZ R, GARCÍA-RISCO MR, FORNARI T, REGLERO G, RAMÍREZ DE MOLINA A. Expression of microRNA-15 b and the glycosyltransferase GCNT3 correlates with antitumor efficacy of Rosemary diterpenes in colon and pancreatic cancer. *PLoS One* 2014; 9: e98556.

SANTOS, H. S; MESQUITA, F. M. R; LEMOS, T. L. G; MONTE, F. J. Q; BRAZ-FILHO, R. Diterpenos casbanos e acetofenonas de *Croton nepetaefolius* (Euphorbiaceae). *Quím Nova* 31(3) (2008) 601.

INCZEDY, J.; LENGYEL, T.; URE, A. M.; Compendium of Analytical Nomenclature. Definitive Rules 1997, "The Orange Book", 3<sup>rd</sup> ed., Blackwell Science: Oxford, 1998.

IOFI Working Group on Methods of Analysis. Guidelines for the quantitative gas chromatography of volatile flavouring substances, from the Working Group on Methods of Analysis of the International Organization of the Flavor Industry (IOFI). Published online in Wiley Online Library: 18 April 2011

LINDE, G.A.; COLAUTO, N.B.; ALBERTÓ, E.; GAZIM, Z.C. Quimiotipos, Extracción, Composición y Aplicaciones del Aceite Esencial de *Lippia alba*. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.18, n.1, p.191-200, 2016.

LORENZI, H. & MATOS, F. J. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas/ Francisco José de Abreu Matos/ Primeira Edição/ Instituto Planta rum/ Nova Odessa/ 512 pp. 2006.

MARTINEZ-VELAZQUEZ, G. A.; CASTILLO-HERRERA, R.; ROSARIO-CRUZ, J. M.; FLORES-FERNANDEZ, J.; LOPEZ-RAMIREZ, R.; HERNANDEZ-GUTIERREZ, E.; LUGO-CERVANTES, C. Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, Berlin, v. 108, n. 2, p. 481-487, 2011.

MAY, A. ; SUGUINO, E. ; MARTINS, A.N. ; BARATA, L.E.S. ; PINHEIRO, M.Q. Produção de biomassa e óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*L.) em função da altura e intervalo entre cortes. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.12, n.2, p.195-200, 2010.

MCMURRY, J. 7º Ed. *Química Orgânica - Combo*. São Paulo: Cengage Learning, 2011. 1344 p.

MELO, J. I. M.; ALVES, I. M.; SOUSA, R. T. M.; BARBOSA, L. M. M. A.; ANDRADE, W. M. *Verbenaceae sensu lato em um trecho da escraso da catarina, Bahia, Brasil. UFERSA, Revista Caatinga*. v.23, n.3, p.41-47. Mossoró, 2010.

MENEZES, P.M.N; BRITO, M.C; LUCCHESI, A.M; LIMA, J.T; RIBEIRO, L.A.A; SILVA, F.S. Atividade farmacológica de óleos essenciais no sistema respiratório: uma revisão sistemática de estudos pré-clínicos. *Rev. Eletr. Farm.*, Goiânia, v. 14, n. 3, p. 16-31, 2017

MONTANARI, R.M., BARBOSA, L.C.A., DEMUNER, A.J., SILVA, C.J., CARVALHO, L.S.E & ANDRADE, N.J. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from verbenaceae species: alternative sources of (E)-caryophyllene and germacrene-D. *Química Nova*, pp. 9-11. 2011

MUHLEN, C.V. Índices de retenção em cromatografia gasosa bidimensional abrangente. *Scientia Chromatographica*. V.1, n.3, 2009

MÜHLEN, C.V; LANÇAS, F.M. *Cromatografia Unificada*. *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 5, 747-753, 2004

OLIVEIRA J.R.; JESUS, D; FIGUEIRA L.W; OLIVEIRA ,F.E; PACHECO SOARES, C; CAMARGO, S.E; JORGE, A.O; OLIVEIRA, L.D. Biological activities of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) extract as analyzed in microorganisms and cells. *Logo of ebmExp Biol Med (Maywood)*. 2017 Mar; 242(6): 625–634.

OLIVEIRA, J.R; JESUS, D; FIGUEIRA, L.W; OLIVEIRA, F.E; SOARES, C.P; CAMARGO, S.E.A; JORGE, A.O.C; OLIVEIRA, L.D. Biological activities of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) extract as analyzed in microorganisms and cells. *Experimental Biology and Medicine* 2017; 242: 625–634

OLIVERO-VERBEL, J., GÜETTE-FERNANDEZ, J., STASHENKO, E. Acute toxicity against *Artemia franciscana* of essential oils isolated from plants of the genus *Lippia* and *Piper* collected in Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, pp. 419-427. 2009

PETIWALA, S.M.; BERHE S, L.I. G; PUTHENVEETIL, A.G; RAHMAN, O; NON, N.L; JOHNSON, J. J. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract modulates CHOP/GADD153 to promote androgen receptor degradation and decreases xenograft tumor growth. *PLoS One* 2014; 9: e89772.

REIS, A.C.; SOUSA, S.M.; VALE, A.A.; PIERRE, P.M.O.; FRANCO, A.L.; CAMPOS, J.M.S.; VIEIRA, R.F. & VICCINI, L.F. *Lippia alba* (Verbenaceae): A New Tropical Autopolyploid Complex. *American Journal of Botany*, pp. 1002-1012, 2014.

RIBEIRO, D.A.; MACÊDO, D.G.; OLIVEIRA, L.G.S.; SARAIVA, M.E.; OLIVEIRA, S.F.; SOUZA, M.M.A.; MENEZES, I.R.A. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.16, n.4, p.912-930, 2014

RIBEIRO, D.S; MELO, D.B; GUIMARÃES, A.G; VELOZO, E.S; Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 33, n. 2, p. 687-696, abr. 2012.

SAINT LAUMER, J-Y.; CICCHETTI, E.; MERLE, P.; EGGER, J. AND CHAINTREAU, A. Quantification in Gas Chromatography: Prediction of Flame Ionization Detector Response Factors from Combustion Enthalpies and Molecular Structures. *Analytical Chemistry*, 82, 6457–6462, 2010.

SALES, M.D.C; SARTOR, E.B; LIMA, A.T.A. Conhecimento da medicina tradicional: a busca dos saberes etnobotânicos por meio das plantas medicinais. I Jornada de Iniciação Científica da FACIG–17 e 18 de Novembro de 2016.

SANTOS, C. L. C. M. Aplicação das técnicas de DLLME e cg-em na identificação dos constituintes químicos do extrato metanólico dos galhos de *Lippia origanoides* H.B.K. Trabalho de conclusão de Curso. UESB. 2015.

SARRAZIN, S. L. F., SILVA, L. A., ASSUNÇÃO, A. P. F., OLIVEIRA, R. B. F. Antimicrobial and Seasonal Evaluation of the Carvacrol-Chemotype Oil from *Lippia origanoides* Kunth. *Journal Molecules*. pp. 1860-1871, 2015.

SERRAZIN, S. L. F., OLIVEIRA, R. B., BARATA, L. E. S., MOURÃO, R. H. V. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippiagrandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. *Food Chemistry*, pp. 1474-1478, 2012.

SILVA, F.S. Estudo Fitoquímico E Farmacológico De *Lippia Thymoides* Mart. & Schauer (Verbenaceae). Tese de doutorado. Universidade Estadual de Feira de Santana. 2012

SILVA, F.S; MENEZES, P.M; DE SÁ P.G; OLIVEIRA A.L; SOUZA E.A.; ALMEIDA, J.R; DE LIMA, J.T; UETANABARO, A.P; SILVA, T.R; PERALTA, E.D; LUCCHESI, A.M. Chemical composition and pharmacological properties of the essential oils obtained seasonally from *Lippia thymoides*. *Pharm Biol*, 2016; 54(1): 25–34.

SIROCCHI, V; DEVLIEGHIERE, F; PEELMAN, N; SAGRATINI, G; MAGGI, F; VITTORI, S; RAGAERT, P. Effect of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil combined with different packaging conditions to extend the shelf life of refrigerated beef meat. *Food Chemistry* Volume 221, 15 April 2017, Pages 1069-1076

SOTO-DOMÍNGUEZ, A., GARCÍA-GARZA, R., RAMÍREZ-CASAS, Y., MORÁN-MARTÍNEZ, J. & SERRANO-GALARDO, L.B. El Extracto Acuoso de Orégano (*Lippiagraveolens* HBK) del Norte de México Tiene Actividad Antioxidante sin mostrar un Efecto Tóxico in vitro e in vivo. *International Journal of Morphology*, pp. 937-944, 2012.

SOUZA, T. J. T.; APEL, M. A.; BORDIGNON, S. A. L.; MATZENBACHER, N. I.; ZUANAZZI, J. A. S.A; HENRIQUES, A. T. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *eupatorium polystachyum* dc. *Revista brasileira de farmacognosia*. São Paulo, SP. Vol. 17, n. 3 (Jul./Set. 2007), p. 368-372

SOUZA, V.C; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. Instituto Plantarum, pp. 674-678, 2012.

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

TORRES, D.C. Estudos dos constituintes químicos do óleo essencial de *Lippia Thymoides* SCHAUER e avaliação do seu potencial antioxidante. Trabalho de Conclusão de Curso. Uesb 2017.

WANG W., LI N, LUO M, ZU Y, EFFERTH T. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. Molecules 2012; 17: 2704–13.