



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – PPGBIOTEC**

**JÉSSICA PIRES FARIAS**

**INFLUÊNCIA DA IDADE DA PLANTA NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E  
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE ERVA-BALEEIRA  
(*Varronia curassavica* Jacq.)**

**PARNAÍBA-PI  
2018**

**JÉSSICA PIRES FARIAS**

**INFLUÊNCIA DA IDADE DA PLANTA NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E  
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE ERVA-BALEEIRA  
(*Varronia curassavica* Jacq.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí – UFPI, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Linha de Pesquisa: Bioquímica aplicada à Biotecnologia.

Orientador: Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite.

Coorientador: Dr. Francisco Artur e Silva Filho.

**PARNAÍBA-PI  
2018**

Ficha Catalográfica elaborada pela Bibliotecária  
Christiane Maria Montenegro Sá Lins CRB/3 – 952

F224i

FARIAS, Jéssica Pires

Influência da idade da planta da composição química e atividades biológicas do óleo essencial de erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.)/ Jéssica Pires Farias. – Parnaíba: Universidade Federal do Piauí - UFPI, 2018.

92 p. il.

Orientador: Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite

Coorientador: Dr. Francisco Artur e Silva Filho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia; Mestrado em Biotecnologia – UFPI, 2018.

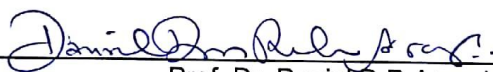
1. Botânica. 2. Plantas medicinais. 3. Óleos essenciais. I. Almeida Leite, José Roberto de Souza de. II. Silva Filho, Francisco Artur e. III. Universidade Federal do Piauí. IV. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. V. Título. CDD 581.634

JÉSSICA PIRES FARIAS

INFLUÊNCIA DA IDADE DA PLANTA NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE ERVA-BALEEIRA (*Varronia curassavica* Jacq.)

Aprovada em: 21 / 03 / 2018

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Daniel D.R. Arcanjo  
Universidade Federal do Piauí-UFPI  
(Membro interno)



Prof. Dr. Patrick Veras Queleães  
Universidade Federal do Piauí-UFPI  
(Membro externo)



Prof. Dr. José Roberto S.A. Leite  
Universidade de Brasília-UNB  
(Orientador)

PARNAÍBA-PI  
2018

Dedico este trabalho à Janinne.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela graça de me permitir seguir essa jornada com perseverança, saúde e força.

À minha mãe Samara e meu pai Jakson, pelo apoio desmedido e amor incondicional. Ao meu irmão Junior pela parceria e à Janinne, por me mostrar a cada dia que tudo pode se tornar possível. Muito obrigada por acreditarem em mim. Aos meus avós Liô e Raimundo pelas orações e palavras de afeto durante os dias ruins. Aos tios, primos, primas e todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse aqui.

Ao meu namorado Lucas e toda a sua família, em especial à Dona Sandra e Camila, que me receberam de braços abertos em seu seio familiar, me dando suporte, apoio e atenção. Com eles aprendi que o significado de amor supera laços sanguíneos.

Aos grandes amigos que Parnaíba me deu. Não poderia deixar de citar Augusto e Alice, presentes da biomedicina que levarei para toda a vida.

Ao meu orientador Dr. José Roberto, o qual aprendi a admirar e respeitar. Foi ele quem plantou a semente do saber científico ainda nas primeiras aulas da graduação. Muito obrigada pelas oportunidades e orientação da iniciação científica ao mestrado. Ao meu coorientador Dr. Francisco Arthur pelo apoio, disponibilidade, empatia, paciência e conhecimentos agregados para a elaboração deste trabalho.

Ao Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia -BIOTEC, por me permitir crescer cientificamente e amadurecer como indivíduo, todos os seus participantes e colaboradores. Ao professor Daniel Arcanjo do Núcleo de Pesquisa em Plantas Mediciniais. Os laços construídos durante esses anos ultrapassaram a contribuição do saber acadêmico. Leiz, Marcinha e Alyne, vocês estarão sempre no meu coração.

À Phytobios Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação LTDA e Centroflora Anidro do Brasil Extrações S.A. pelo apoio tecnológico e todos os subsídios necessários para o desenvolvimento deste projeto. À Dra. Cristina, Raquel e Maurício por me receberem nas empresas com solicitude. Em especial à Adelaide, com quem o convívio diário me proporcionou grandes ensinamentos.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), pela concessão da bolsa.

“Podemos fazer tudo o que quisermos se formos perseverantes”

Hellen Keller

## RESUMO

A escolha da fitoterapia como opção de tratamento é crescente nos últimos anos e deriva principalmente dos efeitos adversos causados por fármacos sintéticos e pela preferência dos consumidores por tratamentos mais "alternativos". O primeiro fitomedicamento produzido no Brasil, o Acheflan®, tem como base o óleo essencial da espécie *Varronia curassavica* Jacq. e possui propriedade anti-inflamatória. A composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas pode ser influenciada por fatores que podem agrupar-se em bióticos e abióticos, e dentre eles, a idade da planta tem se destacado como um dos aspectos que interferem na variação dos constituintes químicos e seus rendimentos. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi averiguar a influência que a idade da planta pode exercer nos constituintes químicos do óleo essencial de *V. curassavica* extraído em escala industrial e nas respostas das atividades antimicrobiana e citotóxica. No capítulo 1 dessa dissertação foi apresentada uma revisão de literatura explanando a importância das plantas medicinais para a manutenção da saúde do homem, dos óleos essenciais e seus respectivos métodos de extração, dos metabólitos secundários e a classe dos terpenos, além das principais características botânicas e farmacológicas da espécie estudada. No capítulo 2, foram apresentados os resultados experimentais, desde a coleta do material vegetal para a extração dos óleos essenciais até a sua caracterização e atividades biológicas. Além disso, como complemento ao trabalho, foi realizado um perfil anatômico da espécie cultivada no acesso do estudo. A composição química dos óleos foi obtida por Cromatografia Gasosa acoplada a espectrômetro de Massas (GC-MS). Como complemento a esta análise foi realizada uma análise estatística multivariada de componentes principais (ACP) e componentes hierárquicos (ACH). Os ensaios antimicrobianos foram realizados pelo método de determinação da concentração inibitória mínima (CIM). O ensaio de citotoxicidade foi determinado pelo método colorimétrico MTT (Brometo de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)]. A análise macroscópica da espécie permitiu identificar que se trata de um arbusto, de 1,5 metros de altura, ramos cilíndricos, com presença de lenticelas e glândulas nos ramos jovens. Na análise microscópica foi possível verificar que a superfície adaxial da folha possui células epidérmicas irregulares, e variedade na quantidade de tipos de tricomas. Os principais constituintes do óleo essencial do estudo são o  $\alpha$ -pineno, trans-cariofileno e alloaromadendreno. Os resultados obtidos da quantificação dos constituintes do óleo mostraram diferença significativa na sua composição quando extraído da planta em diferentes idades. A atividade antibacteriana apresentou uma concentração inibitória mínima (CIM) maior que 1000  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto a atividade antifúngica apresentou uma CIM de 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Ambas as atividades não sofreram alteração com a variável em questão. A resposta citotóxica foi diferente para os óleos essenciais extraídos em diferentes idades da planta, sendo o óleo extraído da planta mais jovem aquele que apresentou menor valor de concentração citotóxica média ( $\text{CC}_{50}$  igual a 47,99  $\mu\text{g/mL}$ ), sugerindo maior citotoxicidade. A ACP e ACH permitiram a diferenciação das amostras de acordo com suas respectivas substâncias de maior importância. A diferença na resposta citotóxica pode ter sido influenciada pela diferença de composição.

**Palavras-chave:** Plantas medicinais, *Cordia verbenacea*, metabólitos, biossíntese.



## ABSTRACT

Using herbal medicine as a treatment option is increasing in recent years and is mainly due to the adverse effects of synthetic drugs and the preference of consumers for more "alternative" treatments. The first phytomedication produced in Brazil, Acheflan®, is based on the essential oil of the species *Varronia curassavica* Jacq and has anti-inflammatory properties. The chemical composition of essential oils of aromatic plants can be influenced by factors that can be grouped in biotic and abiotic, and among them, the age of the plant has been highlighted as one of the aspects that interfere in the variation of chemical constituents and their yields. Thus, the objective of this study was to investigate the possible influence of the plant age on the chemical composition of the essential oil of *V. curassavica* extracted in industrial scale responses and the antimicrobial and cytotoxic activities. In chapter 1 of this dissertation a literature review was presented explaining the importance of medicinal plants for the maintenance of human health, essential oils and their respective extraction methods, secondary metabolites and the terpene class, as well as the main botanical and pharmacological characteristics of species studied. In Chapter 2, the experimental results were presented, from the collection of the vegetal material to the extraction of the essential oils until their characterization and biological activities. In addition, as an adjunct to the study, an anatomical profile of the species cultivated in the study access was performed. The chemical composition of the oils was obtained by Gas Chromatography coupled to Mass spectrometer (GC-MS). As a complement to this analysis, a multivariate statistical analysis of principal components (PCA) and hierarchical components (HCA) was performed. Microbiological assays were performed by the minimum inhibitory concentration (MIC) determination method. The cytotoxicity assay was determined by the colorimetric method MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazole)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide]. The macroscopic analysis of the species allowed us to identify that the species is a shrub, ca 1,5 m high, with cylindrical branches, with lenticels, of glands in young branches. In the microscopic analysis it was possible to verify that the adaxial surface of the leaf has irregular epidermal cells, and variety in the number of types of trichomes. The main constituents of the study essential oil are  $\alpha$ -pinene, trans-caryophyllene and alloaromadendrene. The results obtained from the quantification of the constituents of the oil showed a significant difference in their composition when extracted from the plant at different ages. The antibacterial activity had a minimum inhibitory concentration (MIC) greater than 1000  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , while antifungal activity had a MIC of 1000  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Both activities did not change with the variable in question. The cytotoxic response was different for the essential oils extracted at different plant ages, the oil extracted from the younger plant being the one with the lowest mean cytotoxic concentration ( $\text{CC}_{50}$  equal to 47.99  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), suggesting a higher cytotoxicity. The PCA and HCA analysis allowed the differentiation of the samples according to their respective substances of major importance. The difference in cytotoxic response may have been influenced by the difference in composition.

**Key words:** Medicinal plants, *Cordia verbenacea*, metabolites, biosynthesis.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I:

Figura 1. Sistema de destilação por arraste à vapor. ....	24
Figura 2. Rota biossintética dos metabólitos secundários em plantas. ....	26
Figura 3. Estruturas vegetais de <i>Varronia curassavica</i> Jacq. ....	29
Figura 4. Estrutura química do alfa-humuleno (a), trans-cariofileno (b) e alfa pineno (c).. ....	31
Figura 5. Acheflan®, formulação em creme para uso tópico .....	33

### Capítulo II:

Figura 1. Macroscopia de <i>V. curassavica</i> . Fruto (A); Superfície adaxial da folha (B); Superfície abaxial (C); Flores (D). ....	60
Figura 2. Corte longitudinal da superfície adaxial: células epidérmicas de caráter irregular (A). Corte longitudinal da superfície adaxial: glandula de aporte de óleo essencial (B). Tricoma não glandular cônico com sistólico na base (C). Tricoma glandular com pé composto por 3 a 4 células (D). Corte transversal do caule com foco no esclerênquima (E). Corte transversal da folha, com presença e pelos na superfície abaxial (F). Corte longitudinal da superfície abaxial (G). ....	62
Figura 3. Cromatogramas das amostras de óleos essenciais A, B, C e D .....	63
Figura 4. Curvas analíticas dos compostos alfa-humuleno, trans-cariofileno e alfa-pineno .....	69
Figura 5. Quantificação das substâncias nas amostras de óleo essencial de <i>V. curassavica</i> . ....	71
Figura 6. Gráfico dos scores, CP2 vs CP1, var.total 85,60%, amostras A, B, C e D.. ....	74

Figura 7. Gráfico de loadings, CP2 vs CP1. Influência das variáveis na discriminação das amostras A, B, C e D.....	75
Figura 8. Dendograma representando análise de agrupamentos hierárquicos das amostras de óleo essencial A, B, C e D .....	76
Figura 9. Efeito citotóxico das amostras A, B, C e D em macrófagos peritoneais de murinos BALB/c. Os dados são apresentados como média ± SEM de três experimentos realizados em triplicata * p<0,05; ** p<0,01; *** quando comparado com o controle.. .....	79

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I:

Tabela 1. Classificação dos terpenos.....	27
---	----

### Capítulo II:

Tabela 1. Compostos identificados em óleos essenciais da espécie <i>Varronia curassavica</i> Jacq em diferentes idades extraídos por destilação por arraste à vapor em escala industrial. Tempo de retenção (TR), Índice de Kovats da literatura (IK <sub>.lit</sub> ), Índice de Kovats calculado (IK <sub>.cal</sub> ), Amostra (%): Percentual de área de cada substância relativa ao cromatograma total. ....	65
---	----

Tabela 2. Rendimento dos óleos essenciais extraídos em escala industrial por destilação por arraste a vapor.....	66
--	----

Tabela 3. Dados para a construção da curva analítica do padrão de alfa-humuleno. ....	69
---	----

Tabela 4. Dados para a construção da curva analítica do padrão de trans-cariofileno. ....	70
---	----

Tabela 5. Dados para a construção da curva analítica do padrão de $\alpha$ - pineno. ....	70
---	----

Tabela 6. Determinação dos teores (%) dos compostos alfa-pineno, trans-cariofileno e alfa-humuleno nos óleos essenciais A, B, C e D extraídos de <i>V. curassavica</i> em diferentes idades.....	71
--	----

Tabela 7. Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) para os óleos essenciais A, B, C e D extraídos de <i>V. curassavica</i> de diferentes idades.....	77
---	----

Tabela 8. Efeitos citotóxicos (CC <sub>50</sub> ) contra células de mamíferos para as amostras de óleo essencial. ....	79
--	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABIFISA	Associação Brasileira de empresas do setor Fitoterápico
Acetil-CoA	Enzima Acetil Coenzima-A
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
CC <sub>50</sub>	Concentração Citotóxica que promove redução de 50% de viabilidade celular
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
COX-2	Enzima Cicloxigenase-2
DMSO	Dimetilsulfóxido
FDA	Food and Drug Administration
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
HCA	Análise de Componentes Hierárquicos
HDELTA	Herbário Delta do Parnaíba
MIC	Concentração Inibitória Mínima
MPV	Matéria Prima Vegetal
MTT	Brometo de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de Sódio Dibásico
NaCl	Cloreto de Sódio
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCA	Análise de Componentes Principais
RENISUS	Relação Nacional de plantas medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
RPMI	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
SUS	Sistema Único de Saúde
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral -alfa
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
Geral .....	16
Específicos .....	16
<b>1.CAPITULO I: REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Plantas medicinais.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2 Óleos essenciais .....</b>	<b>19</b>
1.2.1 Enfloração.....	21
1.2.2 Extração por solventes orgânicos.....	21
1.2.3 Prensagem ou expressão .....	22
1.2.4 Extração por fluido supercrítico .....	22
1.2.5 Hidrodestilação .....	23
1.2.6 Destilação por arraste à vapor .....	23
<b>1.3 Metabólitos secundários .....</b>	<b>25</b>
1.3.1 Terpenos.....	27
<b>1.4 <i>Varronia curassavica</i> Jacq. (Erva-baleeira).....</b>	<b>28</b>
1.4.1 Aspectos botânicos e distribuição .....	28
1.4.2 Aspectos fitoquímicos .....	31
1.4.3 Aspectos farmacológicos .....	32
<b>1.5 Referências bibliográficas.....</b>	<b>35</b>
<b>2. CAPITULO II: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE ERVA-BALEEIRA (<i>Varronia curassavica</i> Jacq.) SOB A INFLUÊNCIA DA IDADE DA PLANTA.....</b>	<b>47</b>

## INTRODUÇÃO

O conhecimento histórico da utilização de plantas medicinais mostra ao longo dos tempos que, pela própria necessidade humana, elas foram os primeiros recursos terapêuticos utilizados (MARTINS et al., 1994; RODRIGUES; CARVALHO, 2001). Seu uso na melhoria da saúde do homem evoluiu desde as formas mais simples de tratamento até as formas mais aprimoradas, como a produção em escala industrial de princípios ativos que essas plantas são capazes de sintetizar e armazenar, e que servem de base para medicamentos (LORENZI; MATOS, 2002; ALMASSY JÚNIOR et al., 2005).

A escolha da fitoterapia como opção de tratamento é crescente nos últimos anos, e deriva principalmente dos efeitos adversos causados por fármacos sintéticos, pela preferência dos consumidores por tratamentos mais "naturais " e seu relativo baixo custo (CAÑIGUERAL et al., 2003; MELO et al., 2000). Nesse contexto, no Brasil, o Ministério da Saúde divulgou no ano de 2009, a Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) contendo 71 espécies de plantas medicinais com potencial para gerar produtos com fins terapêuticos. Depois disso, a procura por tratamentos à base de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) mais que dobrou: o crescimento foi acima de 160% (PORTAL BRASIL, 2016).

A "Erva-baleeira", espécie vegetal identificada como *Varronia curassavica* Jacq., de sinónímias *Cordia curassavica* Jacq. Roem. & Schult. e *Cordia verbenacea* DC., (STAPF, 2017) é uma das plantas pertencentes à RENISUS. Seu emprego descrito na medicina popular para doenças osteoarticulares, nevralgias e contusões, levou a uma investigação mais aprofundada de sua ação anti-inflamatória (SILVA Jr. et al, 1995).

Passos e colaboradores (2007) revelaram que o tratamento sistêmico com o óleo essencial de *V.curassavica* nas concentrações de 300-600 mg / kg, reduziu o edema de pata de rato induzido por carragenina, Além disso, o óleo essencial inibiu o edema causado pelo veneno de *Apis mellifera* em ratos sensibilizados e diminuiu significativamente o TNF, sem afetar a produção de interleucina-1. O edema de pata induzido foi marcadamente inibido por dois compostos sesquiterpênicos obtidos a partir do óleo essencial:  $\alpha$ -humuleno e trans-cariofileno (50 mg/kg).

Fernandes e colaboradores (2007) revelaram que o tratamento oral com esses dois compostos isolados do óleo essencial de *V. curassavica* apresentou efeitos inibitórios marcados em diferentes modelos experimentais inflamatórios em camundongos e ratos e foram eficazes na redução do fator de ativação plaquetária, edema de pata de camundongo induzido por bradicinina e ovoalbumina, enquanto que apenas  $\alpha$ -humuleno foi capaz de diminuir a formação de edema causada por injeção de histamina. Os efeitos anti-inflamatórios do  $\alpha$ -humuleno e trans-cariofileno foram comparáveis aos observados em animais tratados com dexametasona, fármaco utilizado como controle positivo. Essa atividade farmacológica comprovada demonstra a importância de *V. curassavica* na medicina tradicional

O potencial farmacológico e a instabilidade da maioria das substâncias químicas que compõem o óleo essencial de plantas aromáticas e medicinais tem despertado atenção de grupos de pesquisa preocupados com a obtenção de um produto de qualidade (BORSATO et al., 2008). O rendimento, bem como a composição química de um óleo essencial depende de vários fatores que podem agrupar-se em ambientais, geográficos, genéticos e fisiológicos como a idade da planta. Diante da vulnerabilidade das substâncias que compõem o óleo essencial da erva-baleeira, tanto a fatores bióticos quanto a fatores abióticos, é comum encontrar na literatura variações de rendimento, composição química e conseqüentemente, resposta biológica (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo averiguar a interferência da idade da planta na composição química e atividades biológicas da espécie *V. curassavica*.



## OBJETIVOS

### Geral

Averiguar a influência da idade da planta na composição química e atividades biológicas do óleo essencial de *Varronia curassavica* Jacq. cultivada na área Agrícola da Centroflora, Tabuleiros Litorâneos - PI e obter o perfil anatômico da planta.

### Específicos

- Obter perfil cromatográfico por GC-MS do óleo essencial de erva-baleeira em diferentes idades, correlacionando qualitativamente os constituintes do óleo;
- Realizar análise multivariada de componentes principais e hierárquicos como forma de diferenciação das amostras;
- Quantificar o alfa-pineno, constituinte majoritário do óleo essencial, nas diferentes amostras;
- Quantificar os sesquiterpenos alfa-humuleno e trans-cariofileno;
- Traçar perfil anatômico da planta cultivada no Piauí, devido as recentes discordâncias com relação à classificação dessa espécie;
- Realizar protocolos de atividade antibacteriana e citotóxica do óleo essencial e averiguar se existe influência da idade da planta nas atividades apresentadas.

## **1.CAPITULO I: REVISÃO DE LITERATURA**

---

## 1.1 Plantas medicinais

Plantas medicinais são aquelas que atuam no combate às doenças, destruindo ou inibindo o desenvolvimento de patógenos. Auxiliam no bom funcionamento do corpo, normalizando o funcionamento dos órgãos, no alívio de sintomas locais e no aumento da resistência do organismo. Além disso, estimulam as defesas naturais e suprem a falta de determinados elementos nutritivos, além de promoverem a recuperação e a manutenção da boa saúde do homem (ALMASSY JÚNIOR et al., 2010).

Desde a antiguidade, as plantas medicinais e outros produtos advindos de recursos naturais são utilizados com eficiência no tratamento de doenças. Evidências históricas e arqueológicas comprovam que as propriedades curativas de ervas medicinais já eram conhecidas desde o período Neolítico, sendo provável assim, que nossos ancestrais tenham reconhecido através da observação da natureza a importância terapêutica das plantas (ALVES, 2013).

A cultura de utilizar fontes naturais como recurso terapêutico vem sendo valorizada pela sociedade do mundo inteiro devido à busca por hábitos de vida mais saudáveis, pelo difícil tratamento de determinadas doenças e por conta do aumento da resistência microbiana a medicamentos já existentes (DE SMET, 2004; GIVEON et al., 2004; ROCHA et al., 2004; BUGNO et al., 2005). A utilização de plantas como fonte de novos medicamentos está se mostrando muito significativa para o tratamento de doenças humanas, causando um grande impacto na indústria farmacêutica (NEWMAN, 2003; NEWMAN e CRAGG, 2007).

Durante séculos as informações terapêuticas acerca do uso de plantas medicinais foram acumuladas e repassadas de geração a geração, fazendo atualmente parte do conhecimento popular de incontáveis sociedades. A aplicação desse saber curativo se constituiu como uma cultura medicinal que desperta o interesse de pesquisadores envolvidos em áreas como botânica, farmacologia e fitoquímica, em respaldar a ação farmacológica dessas plantas através da ciência (MACIEL et al., 2002).

Os fitoterápicos representam uma porção significativa do mercado mundial de medicamentos, com crescimento nas vendas de 15% ao ano. Em termos globais, do total de US\$ 320 bilhões em vendas anuais de produtos farmacêuticos, o mercado de fitoterápicos movimenta cerca de US\$ 20 bilhões todos os anos e está em ascensão,

principalmente pelo interesse das pessoas por mais qualidade de vida (VALÉCIO, 2016). De acordo com a Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde (ABIFISA), o mercado de fitoterápicos brasileiro apresentou crescimento em torno de 8% comparado ao mesmo período de 2014, que havia crescido 6,1% em relação ao ano anterior.

Como qualquer outro medicamento, aqueles baseados em plantas medicinais carecem da comprovação de sua eficiência e segurança para uso. Procedimentos de controle de qualidade devem ser estabelecidos em toda a sua cadeia produtiva, desde o seu plantio, passando por todos os processos até a obtenção da droga vegetal e medicamento pronto para a comercialização. Para a promoção da manutenção da qualidade do material vegetal é indispensável a determinação dos seus constituintes químicos, visando o conhecimento dos seus princípios ativos e possíveis efeitos, para que sejam confirmadas a fidedignidade e repetibilidade dos dados clínicos e farmacológicos (SOUZA-MOREIRA et al., 2010).

Para o controle de qualidade do material vegetal, devem ser aplicadas metodologias químicas de análise como Cromatografia de Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou Cromatografia Gasosa (CG), metodologias botânicas, para identificação da espécie, como o preparo de exsiccatas, além de metodologias de controle de qualidade microbiológico (DRASARA; MORAVCOVA, 2004; FAMEI et al., 2006; LIU et al., 2007).

Para que se faça o uso adequado das plantas medicinais, é necessária a identificação da doença ou dos sintomas apresentados, assim como a escolha correta da planta a ser utilizada, modo de preparo e quantidade. Além disso, um dos cuidados mais necessários é obter, com especialistas ou indivíduos que possuem tradição na utilização desse material vegetal a identificação correta para reduzir os riscos da utilização de plantas não indicadas para a doença (SOUZA-MOREIRA et al., 2010).

## **1.2 Óleos essenciais**

O óleo essencial constitui-se como uma mistura complexa de substâncias orgânicas voláteis, definido como um produto obtido ou através do processo de destilação por arraste à vapor de determinadas partes de plantas aromáticas ou do processamento mecânico de pericarpos de frutos cítricos (SIMOES, 2001). Seus constituintes variam de terpenos, aldeídos, cetonas, ácidos inorgânicos, lactonas,

óxidos, até compostos sulfurados, que se apresentam em diferentes concentrações. Normalmente, são líquidos de aparência oleosa a temperatura ambiente, que são solúveis em solventes apolares, possuem baixa solubilidade em água, baixa estabilidade e de sabor ácido e picante. A maioria dos óleos possui índice de refração e são opticamente ativos.

Os óleos essenciais são pouco encontrados em monocotiledôneas (com exceção das gramíneas e zingiberáceas) e em gimnospermas, com exceção das coníferas. Angiospermas dicotiledôneas pertencentes as Famílias Asteraceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Piperaceae e Rutaceae são alguns dos exemplos de plantas ricas em óleos essenciais (HEGNAUER, 1990) que podem estar estocados nas folhas (capim-limão), flores (laranjeira), cascas do caule (canela), raízes, rizomas (cúrcuma), sementes (noz-moscada) ou frutos (BAKKALI et al., 2008).

De acordo com Girard (2005), o uso de óleos essenciais ocorre desde a antiguidade. Na China, Índia e Oriente Médio eram utilizados na perfumaria, cosméticos, cozinha, medicina e práticas religiosas. Com o passar do tempo e maior desenvolvimento da química orgânica, as composições químicas começaram a ser reveladas, surgindo novas fragrâncias e usos. Na década de setenta, desenvolveu-se a cromatografia e a espectrometria, auxiliando cada vez mais no estudo das composições.

A composição química, fragrância e características físico-químicas dos óleos essenciais podem se distinguir a depender do órgão da planta que foi extraído. Além disso, a composição química de óleos extraídos do mesmo órgão pode variar significativamente de acordo com fatores bióticos e abióticos (SIMÕES et al., 2001). Recomenda-se que as plantas aromáticas utilizadas na extração desses óleos recebam atenção especial tanto no período da colheita, pós-colheita e principalmente na armazenagem, que deve ser feita em recipientes bem fechados, para evitar maiores perdas (CASTRO et al., 2010). De maneira geral, por serem constituídos em sua grande maioria por substâncias voláteis, não são muito estáveis, principalmente em presença de ar, luz, calor, umidade e metais (COSTA et al., 2008).

A quantidade, bem como a diversidade das substâncias que compõem esses óleos é que determinam a ampla variedade de suas ações farmacológicas. Estas, são bem descritas na literatura, e dentre elas destacam-se atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antiespasmódica, anestésica e ação estimulante de secreções do

aparelho digestivo. Enquanto a toxicidade crônica desses óleos ainda é pouco conhecida, sendo primordial a realização de mais pesquisas que possam elucidar eventuais efeitos mutagênicos, estudos de toxicidade aguda revelam desde reações cutâneas a efeitos no sistema nervoso central.

O Brasil, assim como a Índia, China e Indonésia é reconhecido mundialmente pela produção de óleos essenciais, tendo destaque na exportação dos óleos de pau-rosa, sassafrás e menta e principalmente dos óleos de origem cítrica, subprodutos da indústria de sucos. Entretanto, problemas como a falta de manutenção do padrão de qualidade, a baixa representatividade nacional e os poucos investimentos governamentais geraram um quadro estático no setor (BIZZO et al., 2009).

Diversas metodologias podem ser empregadas na extração de óleos essenciais de plantas aromáticas (CASSEL et al., 2009). A escolha do método utilizado no processo bem como as condições operacionais estabelecidas pode causar uma variação significativa no rendimento do óleo essencial e dos seus constituintes químicos (SERAFINI et al., 2002). Os métodos de extração mais utilizados são: destilação por arraste a vapor d'água, extração por solventes orgânicos, hidrodestilação, extração por fluido supercrítico, enfloração e prensagem (YUSOFF et al., 2011).

### 1.2.1 Enfloração

É um método extrativo empregado para obtenção de óleo essencial de pétalas de flores como a laranjeira, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, utilizado por algumas indústrias de perfumaria. Trata-se de um processo caro e demorado, aplicado principalmente em plantas com baixo teor de óleo que possuem alto valor comercial. A extração consiste em depositar as pétalas sobre uma placa com gordura de origem vegetal ou animal durante determinado período. As pétalas esgotadas são então substituídas por pétalas novas até atingir saturação. Nesse momento, a gordura é tratada com álcool, que posteriormente será destilado para obtenção do óleo essencial (SIMÕES; SPITZER, 2003).

### 1.2.2 Extração por solventes orgânicos

Na maioria das vezes, recorre-se a esse método de extração quando o material vegetal possui baixo rendimento de óleo essencial ou quando a substância de interesse não consegue ser extraída pelos métodos convencionais de destilação. Nesse processo, a extração do óleo essencial é realizada através da utilização de solventes orgânicos, na maioria das vezes, de caráter apolar, tais como diclorometano, éter, metanol e hexano (GROSSMAN, 2005).

No entanto, além de extrair o óleo essencial, esses solventes ao interagirem com outras substâncias possibilitam a extração de compostos indesejados, como ceras e pigmentos, e a geração de resíduos químicos, tornando inapropriada a utilização do óleo para fins medicinais, já que este pode conter algum resquício de solvente (NEVES, 2011).

### 1.2.3 Prensagem ou expressão

É utilizado para a obtenção de óleos essenciais extraídos de frutos cítricos. Neste processo, a camada que contém o óleo essencial é obtida após a prensagem do pericarpo dos frutos cítricos. Posteriormente, o óleo obtido é separado da emulsão formada com a água pelos processos de decantação, centrifugação ou destilação fracionada (WOLFFENBÜTTEL, 2010).

### 1.2.4 Extração por fluido supercrítico

O fluido supercrítico é obtido pela compressão e aquecimento de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) a uma temperatura superior a 31 °C. Nessas condições, ele atinge um quarto estado físico, onde sua viscosidade é próxima a de um gás e sua capacidade de solubilização é elevada como a de um líquido. O processo de extração é realizado utilizando condições supercríticas para que se consiga extrair o óleo essencial do material vegetal utilizado. Após a extração, a pressão é reduzida, fazendo com que o CO<sub>2</sub> retorne ao estado gasoso, sendo eliminado do material oleoso obtido (SANTOS et al., 2011).

A vantagem desse método é o fato de que os componentes do óleo essencial praticamente não sofrem hidrólise, esterificação ou alterações térmicas. O principal obstáculo para o uso desse processo na indústria ainda é o alto custo fixo de

investimento necessário para a sua instalação (PEREIRA e MEIRELES, 2010; MAUL et al., 1996).

#### 1.2.5 Hidrodestilação

É o método de extração no qual os constituintes do óleo essencial do material vegetal, em contato com a água aquecida, recebem pressão das moléculas de vapor de água entrando em ebulição. No estado volátil, estes constituintes serão condensados e separados da água. O método é empregado com o uso de aparelho tipo Clevenger, conforme preconiza a Farmacopeia Brasileira (BIASI; DESCHAMPS, 2009).

#### 1.2.6 Destilação por arraste à vapor

É um processo de extração tradicional utilizado na obtenção dos óleos essenciais a partir de partes aéreas de plantas aromáticas, que se baseia principalmente na diferença de volatilidade dos constituintes da matéria prima vegetal. É um método extrativo utilizado principalmente pela indústria por ser mais versátil comercialmente e não necessita de altos investimentos como técnicas mais avançadas como o fluido supercrítico (CASSEL; VARGAS, 2006)

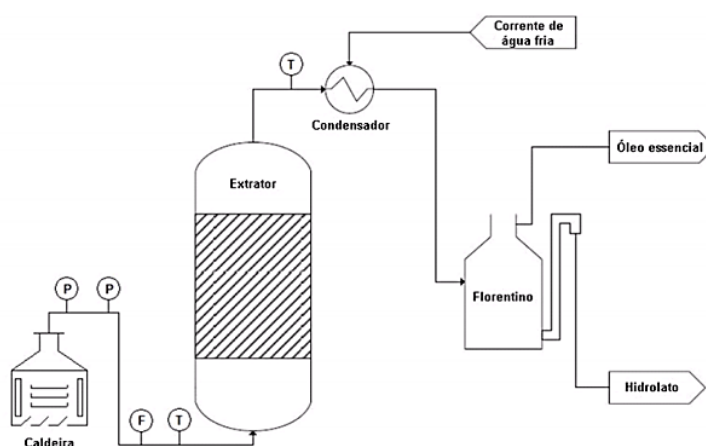
Este processo utiliza uma caldeira para geração de vapor, um extrator (destilador), onde é colocada a matéria prima a ser extraída, um condensador e um frasco de coleta ou vaso florentino (FÜLLER, 2008). O vapor é percolado através do leito de sólidos, no interior do destilador, arrastando o óleo essencial. A mistura vapor-óleo segue então para o condensador, onde ocorre a mudança de fase. O condensado é alimentado no frasco de coleta, onde ocorre a separação das fases, por diferenças de polaridade, já que os óleos essenciais são apolares ou pouco polares (Figura 1) (STEFFANI, 2003).

Dois produtos são obtidos durante o processo de destilação por arraste à vapor: o óleo essencial e o hidrolato, que é a água destilada durante a extração. O hidrolato, apesar de na maioria das vezes ser descartado pela indústria, possui resquícios de substâncias com atividade biológica e pequenas quantidades de compostos aromatizantes advindos do óleo essencial, possuindo potencial para ser



utilizado como fragrância nos setores industriais de cosmética e alimentos (LEAL et al., 2008).

**Figura 1.** Sistema de destilação por arraste à vapor.



Fonte: Sartor (2009)

Alguns aspectos devem ser considerados para a obtenção do óleo essencial através dessa técnica. O material vegetal utilizado no processo de destilação deve ser preparado previamente para que se assegure uma extração eficiente e completa do óleo essencial contido nos órgãos vegetais (KOKETSU; GONÇALVES, 1991). Em linhas gerais, a depender da parte da planta utilizada no processo, a realização de fragmentações ou triturações nesse material permite uma redução em sua espessura, e torna mais fácil a remoção dos seus constituintes voláteis.

Flores, folhas e outras partes não fibrosas da planta podem ser destiladas sem necessitarem de fragmentação. As sementes, por sua vez, devem ser trituradas para que se consiga romper a paredes celulares e aumentar a superfície de contato entre o vapor de arraste e o óleo essencial. Raízes, caules, cascas e outras partes lenhosas precisam ser fragmentadas em pedaços pequenos (GÜNTHER, 1948).

É importante ressaltar que, após o material vegetal ser colhido e triturado, deve seguir de forma imediata para o processo de destilação para que não haja perda dos seus componentes voláteis, ocasionando redução do rendimento da extração ou alterações em sua composição química. Quando não for possível realizar a extração de forma imediata, o material deve ser armazenado em ambiente livre de circulação

de ar, preferencialmente à baixas temperaturas para que se minimize a volatilização ou oxidação do óleo essencial.

Esse método de extração de óleos essenciais, apesar de ser simples e barato, pode apresentar algumas limitações no que se refere à quantidade e qualidade do produto obtido. Durante o processo, a água, acidez, temperatura e pressão utilizadas na extração podem provocar degradação térmica ou hidrólise dos metabólitos secundários constituintes do óleo, interferindo na sua qualidade final ou até mesmo na sua ação terapêutica. A degradação dos princípios ativos pode gerar compostos de baixa eficácia ou até mesmo, tóxicos (SIMÕES; SPITZER, 1999).

### **1.3 Metabólitos secundários**

Segundo Taiz e Zeiguer (2009), os metabólitos secundários são compostos orgânicos que podem agir como atrativos para animais polinizadores e dispersores de sementes e influenciar na defesa da planta contra herbívoros e infecções causadas por microorganismos patogênicos. Sua origem pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato.

Eles representam uma interface química entre as plantas e o ambiente. Os estímulos decorrentes do ambiente, no qual a planta se encontra, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos. Dentre estes fatores, podem-se ressaltar as interações planta/microorganismos, planta/insetos e planta/planta, idade e estágio de desenvolvimento, fatores abióticos como luminosidade, temperatura, pluviosidade e nutrição (MORAIS, 2009).

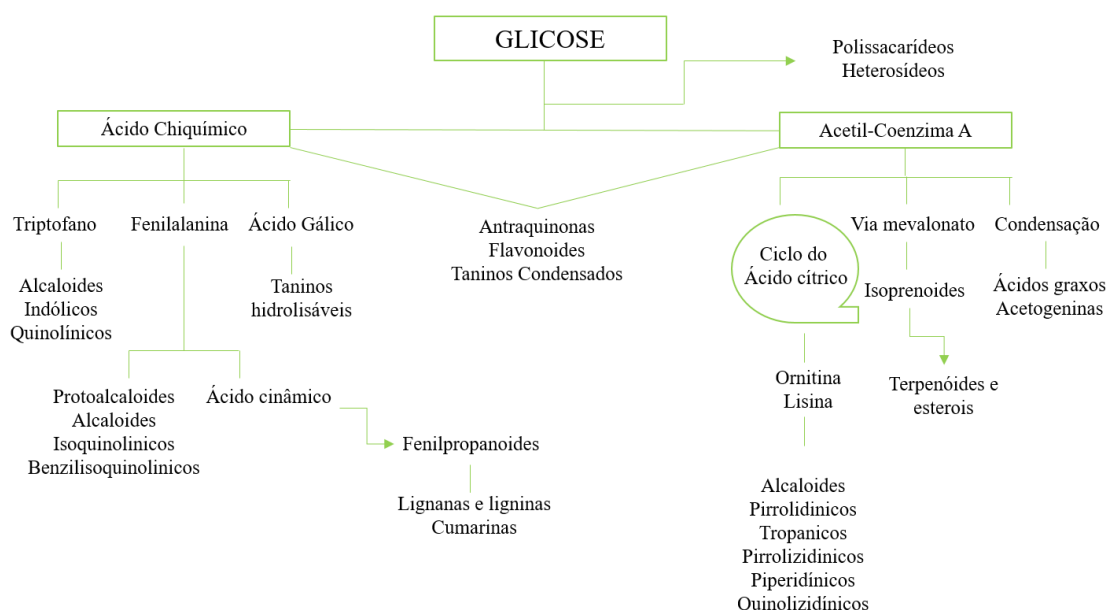
Sua biossíntese nas plantas depende de fatores que podem ser genéticos, fisiológicos e ambientais, que podem interferir diretamente no teor de princípios ativos produzidos. Alguns desses fatores podem apresentar correlações entre si e não atuar de maneira isolada, podendo influenciar a síntese de moléculas bioativas de maneira conjunta. Ressalta-se ainda que, muitas vezes, as variações nesse teor podem ser derivadas do desenvolvimento foliar e/ou surgimento de novos órgãos simultaneamente a uma estabilidade no conteúdo total de metabólitos secundários (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Dessa maneira, os fatores que influenciam as variações nas concentrações destes princípios devem ser avaliados, visando obter matéria-prima de melhor qualidade, já que a qualidade das plantas medicinais e sua eficácia terapêutica estão relacionadas ao seu teor de princípios ativos (FREITAS et al., 2004).

Nos últimos anos, metabólitos derivados de plantas, tais como flavonoides, terpenos, alcaloides e óleos essenciais tem recebido uma atenção considerável por conta de suas propriedades farmacológicas (BARNABE, 2008). O enorme número de compostos encontrados atualmente possibilita a triagem de novos fármacos com eficácia antimicrobiana, anti-inflamatória e antiparasitária a partir da diversidade molecular de algumas plantas (BARREIRO, 2009).

A síntese dos metabólitos secundários (Figura 2) tem origem no metabolismo da glicose, que é convertida em moléculas de ácido pirúvico que podem seguir duas vias distintas: a primeira, na qual as moléculas de piruvato entram na via do ácido chiquímico para a formação dos metabólitos secundários aromáticos (taninos hidrolisáveis, alcaloides, fenilpropanoides, ligninas e cumarinas) e a segunda, em que o piruvato continua sendo oxidado até a formação de moléculas de acetil-coenzima A (SANTOS, 2007).

**Figura 2.** Rota biossintética dos metabólitos secundários em plantas.



Adaptado de Simões et al. (2010)

### 1.3.1 Terpenos

Os terpenos são sintetizados a partir do acetil-Coenzima A via rota do ácido mevalônico. O metabolismo do acetil-CoA gera um diversificado grupo de metabólitos secundários, os isoprenoides ou terpenoides, que representam a segunda classe com maior número de constituintes ativos (RAVEN, 2001; VERPOORTE; MARASCHIN, 2001).

Podem ser definidos como um grupo de moléculas, frequentemente encontradas em óleos essenciais e responsáveis pela fragrância das plantas, cuja estrutura está baseada em um número definido de unidades isoprênicas (metil-buta-1,3-dieno) com cinco átomos de carbono (SIMÕES; SPITZER, 1999; LARCHER, 2000; RAVEN, 2001).

No decorrer do século XIX, estudos químicos realizados com a terebintina, produto extraído da destilação da resina de coníferas, levaram à denominação de *terpene* os hidrocarbonetos com a fórmula geral  $(C_5H_8)_n$ . As estruturas químicas formadas através da junção de duas, três, quatro, cinco, seis e oito unidades isoprênicas são chamadas de mono, sesqui, di, sester, tri e tetraterpenos, respectivamente (Tabela 1) (LIMA et al., 2003).

**Tabela 1** Classificação dos terpenos

ÁTOMOS DE CARBONO	UNIDADES ISOPRENICAS (Nº)	CLASSIFICAÇÃO
10	2	MONOTERPENO
15	3	SESQUITERPENO
20	4	DITERPENO
25	5	SESTERTERPENO
30	6	TRITERPENO
40	8	TETRATERPENO

Fonte: Adaptado de LIMA et al., (2003)

Essa classe de moléculas está presente em pequenas quantidades em organismos vivos, onde desempenham numerosos papéis vitais na fisiologia das plantas bem como funções importantes nas membranas celulares. A grande maioria apresenta baixo peso molecular, natureza lipofílica, grande variedade de estruturas e alta pressão de vapor à temperatura ambiente (BAKKALI et al., 2008). Além disso, são componentes de ceras, borrachas, resinas e bálsamos.

Os monoterpenos são conhecidos como constituintes da essência volátil de flores e óleos essenciais extraídos de plantas medicinais e ervas aromáticas, justificando sua importância para a indústria de perfumes e aromatizantes. O geraniol, mentol, linalool e o citral são exemplos de monoterpenos (LIMA et al., 2003). Assim como os monoterpenos, muitos sesquiterpenos também possuem importância biológica.

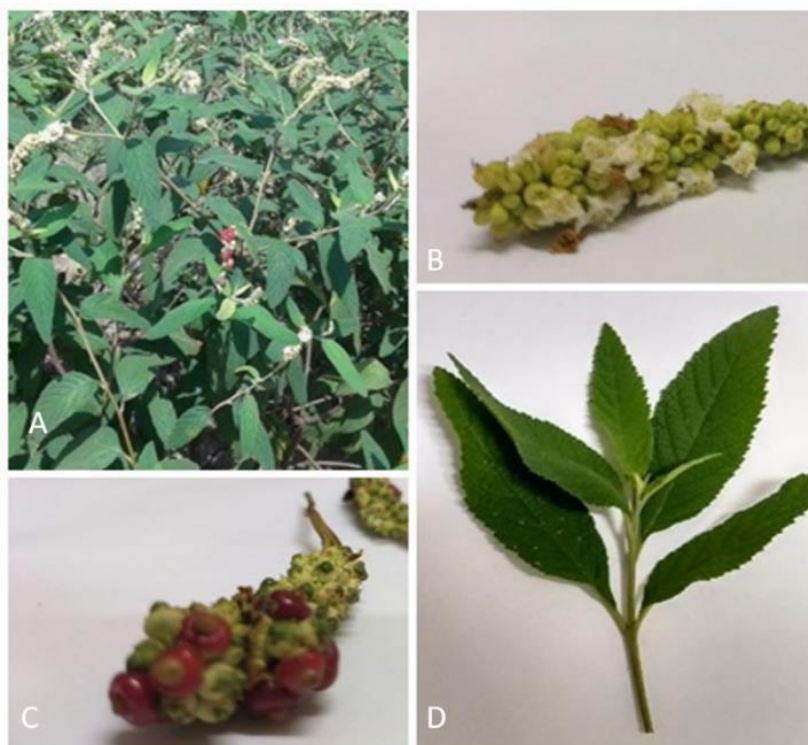
#### **1.4 *Varronia curassavica* Jacq. (Erva-baleeira)**

##### 1.4.1 Aspectos botânicos e distribuição

A espécie vegetal identificada como *Varronia curassavica* Jacq., de sinônimas *Cordia curassavica* Jacq. Roem. & Schult. e *Cordia verbenacea* DC., (STAPF, 2017), é uma planta popularmente conhecida como erva baleeira, pertencente à família Boraginaceae. Tal espécie é encontrada nas regiões tropical e subtropical do globo, sendo nativa em grande parte do Brasil, encontrada em abundância no litoral (LADEIRA, 2002). Sua utilização na medicina popular é vasta: chás feitos a partir de suas folhas são usados para tratamento de artrites, problemas de coluna e reumatismo.

É um arbusto muito ramificado, ereto e aromático, com hastes cobertas por casca fibrosa e com altura de 1,5 a 2,5 metros (Figura 3a). As flores são pequenas, brancas e dispostas em inflorescências racemosas de 10-15 cm de comprimento (Figura 3b). Os frutos são cariopses esféricas que quando maduros apresentam coloração vermelha (Figura 3c). Folhas simples, alternas, coriáceas, aromáticas de 5-10 cm de comprimento (Figura 3d), são utilizadas na medicina popular devido às suas propriedades anti-inflamatória, analgésica e cicatrizante (LORENZI; MATOS, 2008).

**Figura 3.** Estruturas vegetais de *Varronia curassavica* Jacq.



Fonte: acervo pessoal do autor

A família Boraginaceae é dividida em quatro diferentes famílias, sendo o gênero *Cordia* subdividido em quatro cladros (*Varronia*, *Sebestena*, *Collococcus* e *Myxa*). A diversidade morfológica entre os gêneros tem originado muita discussão e *Varronia* tem sido proposto como gênero que engloba várias espécies antes pertencentes à *Cordia* (TÖLKE et al., 2013). Recentemente, o Angiosperm Phylogeny Group (2016) reconheceu a ordem Boraginales, sendo esta composta por oito Famílias: Codonaceae, Wellstediaceae, Boraginaceae, Hydrophyllaceae, Namaceae, Heliotropiaceae, Cordiaceae e Ehretiaceae, indicando grande diversidade e a complexa divisão do grupo.

Dessa maneira, diversos estudos morfológicos e anatômicos da folha e do caule de *V. curassavica* foram desenvolvidos no intuito de identificar marcadores anatômicos que pudessem ser utilizados para a diferenciação dessa espécie vegetal de outras matérias-primas vegetais. Pereira (2013) encontrou tanto na epiderme adaxial quanto na abaxial a presença de tricoma tector unicelular com base pluricelular e tricoma glandular de cabeça unicelular. Feijó, Oliveira e Costa (2014) verificaram o

efeito da irradiância sobre a densidade dos tricomas, enquanto Ventrella e Marinho (2008) caracterizaram a morfologia dos tricomas glandulares e sua histoquímica. Leal-Costa e Amélia (2017) focaram na descrição da anatomia foliar da espécie: folhas simétricas, de ápice agudo e base decorrente, limbo ovalado e lanceolado, pubescentes em ambas as faces, hipoestomáticas e de margens irregularmente denteadas.

O gênero *Varronia* é distribuído nas regiões tropical e subtropical do mundo, ocorrendo na Austrália, Nova Caledônia, América Central, Guiana e no Brasil (RAPISARDA et al., 1997). No Brasil, a espécie *Varronia curassavica* Jacq. é um arbusto nativo das restingas marítimas de quase todo litoral, apresentando uma ocorrência mais comum na costa litorânea dos estados de Santa Catarina e São Paulo, ocorrendo também no Cerrado, nos estados de Minas Gerais e de Goiás (LORENZI; MATOS, 2008; PIANOWSKI, 2005; VAZ et al., 2006). A espécie é, ainda, encontrada em áreas sazonalmente secas, e é considerada como um importante elemento nas florestas tropicais decíduas, em florestas arbustivas e em florestas tropicais úmidas (GOTTSCHLING et al., 2005).

Arrigoni-Blank *et al.* (1999) abordam que a erva-baleeira é uma espécie com baixa exigência nutricional e elevada eficiência de absorção e utilização dos nutrientes. Entretanto os autores afirmam que, quando a espécie é cultivada em solos ácidos e de baixa fertilidade, devem ser feitas essencialmente a calagem e a adubação para incrementar o seu desenvolvimento, uma vez que a omissão da calagem e dos nutrientes nitrogênio e potássio levou às maiores quedas na produção de folhas, órgão esse que é primordial na obtenção do óleo essencial da espécie. A propagação da espécie pode ser realizada, principalmente, utilizando sementes, mas também por estacas de ramos novos (GILBERT; FAVORETO, 2012; MAGALHÃES, 2010).

Segundo Montanari Júnior (2011), a planta é uma espécie perene que pode ser colhida regularmente. Uma lavoura de *V. curassavica*, após três anos, pode atingir produção de biomassa de 16.000 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>, suficiente para produzir 10 kg de óleo essencial. Utilizando genótipos selecionados e com melhores técnicas de cultivo, pode-se atingir 25 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de óleo essencial (MORANDI, 2009).

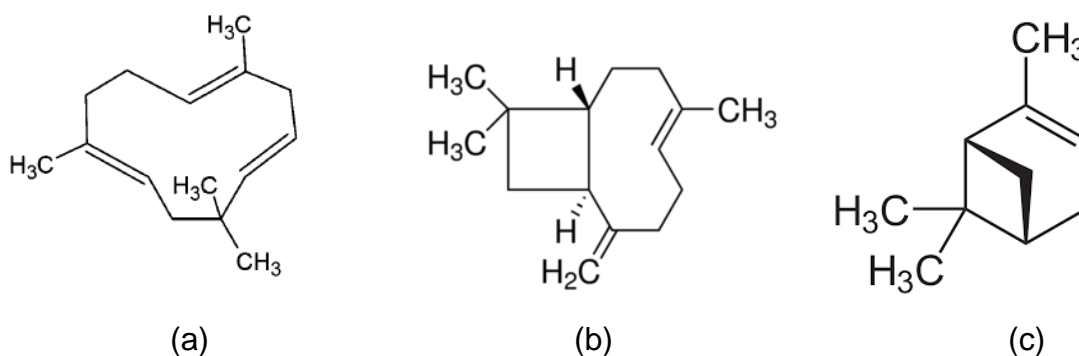
#### 1.4.2 Aspectos fitoquímicos

A Análise das folhas frescas de *V. curassavica* demonstrou presença de óleo essencial apresentando como constituintes majoritários o  $\alpha$ -pineno, transcariofileno, alloaromadendreno e  $\alpha$ -humuleno. Também foram observados  $\beta$ -felandreno, citronelol acetato,  $\beta$ -elemeno,  $\beta$ -gurjuneno, biciclogermacreno, espatulenol e epoxicariofileno (CARVALHO JR et al., 2004).

Em outro trabalho, Santo et al. (2006) encontraram monoterpenos (47,3%) e sesquiterpenos (43,9%), entre os quais  $\alpha$ -pineno (20,5%),  $\beta$ -pineno (13,1%), transcariofileno (12,4%) e biciclogermacreno (13,8%) como compostos predominantes do óleo essencial das folhas de *V. curassavica*. O  $\alpha$ -pineno é um dos principais constituintes dos óleos essenciais de plantas aromáticas extraídos de folhas, sementes, caules e frutos (COELHO-DE-SOUZA et al., 2005).

Um dos flavonoides encontrados por Sertié et al., (1990) e Bayeux et al., (2002) na folha da dessa espécie foi a artemetina, substância com poderosa ação anti-inflamatória e cicatrizante, que pode atuar no ciclo celular e inibir a ação da lipoxigenase (CHOUDHARY et al., 2009). O ácido rosmarínico foi encontrado no extrato hidroalcoólico das folhas de erva baleeira (HAGE-MELIM, 2009). O ácido caféico e ácidos graxos são encontrados no óleo da semente (SEIGLER et a., 1970). Também há outros flavonóides presentes descritos por Almeida et al., (2009).

**Figura 4.** Estrutura química do alfa-humuleno (a) trans-cariofileno (b) e alfa-pineno (c).



Fonte: Beck et al (2011)



### 1.4.3 Aspectos farmacológicos

Para fins medicinais, segundo a literatura etnofarmacológica, é utilizada na forma de chá para artrite, reumatismo e problemas de coluna (SILVA JR et al., 1995). Na medicina popular também é utilizada para o tratamento de prostatites, nevralgias e contusões, como tônico e cicatrizante (LORENZI; MATOS, 2008). Akisue et al. (1993) mencionam o chá das folhas como homeostático e no tratamento de tumores. Na medicina tradicional é utilizada como anti-inflamatório, analgésico e anti-úlceras (VENTRELLA et al., 2008).

A erva-baleeira tem sua eficácia reconhecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e está incluída no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira e na lista da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, a RENISUS (BRASIL, 2011; BRASIL, 2014). De acordo com Souza et al. (2012), foi incluída no Programa Componente Verde da Rede Farmácias de Minas, juntamente com outras 15 espécies pré-selecionadas, por meio de validação científica, mostrando, com isso, a importância dessa espécie.

Realizou-se um levantamento do mercado dos medicamentos anti-inflamatórios, sendo possível elaborar um plano para a produção sustentável de um novo fitoterápico no Brasil. Assim, o medicamento desenvolvido a partir do óleo essencial da *V. curassavica*, o Acheflan® (Figura 5), utiliza uma mistura padronizada, que contém o  $\alpha$ -humuleno e o trans-cariofileno como componentes ativos. Para o desenvolvimento do medicamento, é necessário que o óleo seja padronizado e que contenha um teor mínimo de 2,3% a 2,9% v/v de alfa-humuleno (MAGALHÃES, 2010; QUISPE-CONDORI, 2008). Esse medicamento, mediante aprovação pela Food and Drug Administration (FDA), tem sido enviado aos Estados Unidos, ao Canadá e ao Japão (BOLZANI et al., 2012).

Fernandes et al. (2007) avaliaram o efeito anti-inflamatório do alfa-humuleno e trans-cariofileno isolados do óleo essencial da erva-baleeira. Esses autores afirmam que esses compostos atuam interferindo na ação de substâncias mediadoras do processo inflamatório e na regulação da expressão de proteínas responsáveis por esse processo. Afirmam, ainda, que cada um atua por meio de mecanismos de ação distintos e ainda não muito bem explorados.

**Figura 5.** Acheflan, formulação em creme para uso tópico.



Fonte: Imagem de domínio público

Por meio do estudo farmacológico biomonitorado e de testes individuais dos compostos, o  $\alpha$ -humuleno foi considerado como o principal composto responsável pela atividade anti-inflamatória. Esse composto atua inibindo a enzima ciclo-oxigenase 2 (COX 2) que está presente no metabolismo das prostaglandinas, que são substâncias envolvidas nos processos inflamatórios e na sintomatologia desses processos (DORES et al., 2010; SANTOS et al., 2007).

Ambos os compostos são substâncias pertencentes à classe dos terpenos, que é o grupo mais abundante e estruturalmente diverso dos metabólitos naturais de plantas (THOLL, 2006). Esses compostos são sintetizados pela enzima terpeno-sintetase, que catalisam as reações de formação dos monoterpenos e dos sesquiterpenos, e demais grupos de terpenos. Atuam formando compostos individuais ou vários produtos ao mesmo tempo. Entretanto, são necessários mais estudos para entender a estrutura e as funções dessas enzimas e como elas conseguem catalisar a com elevada especificidade (DEGENHARDT *et al.*, 2009; THOLL, 2006).

Outros estudos para utilização do óleo como fitomedicamento por via oral estão em fase de conclusão e os resultados são promissores (PASSOS et al., 2007), evidenciando que a administração oral do óleo essencial apresenta um pronunciado efeito anti-inflamatório em diversos modelos de inflamação, tanto em ratos quanto em camundongos, possivelmente por interferir com a expressão da citocina Fator de Necrose Tumoral alfa- TNF $\alpha$ .

Matias et al. (2013) não encontraram ação antibacteriana clinicamente significativa do extrato e das frações do extrato das folhas, quando esses foram utilizados isolados. Somente quando foram combinados com aminoglicosídeos,

apresentaram atividade sinérgica significativa. Oliveira et al. (2011) avaliaram o efeito do extrato etanólico de folhas de erva - baleeira sobre a ação de mastócitos. Essas células produzem histamina, que é mediadora do processo pró- inflamatório em diferentes espécies de animais. Os autores observaram que o extrato das folhas inibiu a secreção da histamina in vitro e in vivo. Afirmam, ainda, que a espécie possui efeito terapêutico no tratamento de doenças alérgicas que envolvem a histamina no processo, como asma, rinite, alergias alimentares e dermatites.

Rodrigues et al. (2012) indicam o óleo essencial das folhas de erva - baleeira como adjuvante de antibióticos com ação sobre os fungos *Candida albicans* e *Candida krusei* e sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*.

## 1.5 Referências bibliográficas

AKISUE, M.K.; OLIVEIRA, F.; MORAES, M.S.; AKISUE, G.; MANCINI, B. Caracterização farmacognóstica da droga e da tintura de *Cordia verbenaceae* DC Boraginaceae. **Revista de Ciências Farmaceuticas**, São Paulo, v.5, p. 69-82, 1993.

ALMASSY JÚNIOR, A.A.; LOPES, R.C.; ARMOND, C.; SILVA, F.; CASALI, V.W.D. Folhas de chá: plantas medicinais na terapêutica humana. Viçosa: **Editora da Universidade Federal de Viçosa- UFV**, 2005. 233p.

ALMEIDA, S. A. de. **Micropropagação, teor e constituição química do óleo essencial de Gerânio (*Pelargonium graveolens* L.)**. 2009. 66 p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE.

ALVES, G.S.P.; POVH, J.A. Estudo etnobotânico de plantas medicinais na comunidade de Santa Rita, Ituiutaba – MG. **Biotemas**, v. 26, p. 231-242, 2013.

ARRIGONI-BLANK, M. F.; FAQUIN, V.; PINTO, J. E. B. P.; BLANK, A.F.; LAMEIRA, O. A. Adubação química e calagem em erva-baleeira (*Cordia verbenacea*). **Horticultura Brasileira**, v.17, p. 211-215, 1999.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils- A review. **Food Chemistry Toxicology**. v. 46, p.446-475, 2008.

BARNABÉ, E. C. **Extração de Pilocarpina e epiisopiloturina de Jaborandi utilizando processos envolvendo solventes supercríticos**. 2008. 99 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, SP.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI V. S. Biodiversidade: fonte potencial para descoberta de fármacos. **Química nova**, v. 32, p. 699-678, 2009.

BAYEUX, M.C.; FERNANDES, A.T.; FOFLIO, M.A.; CARVALHO, J.E. Evaluation of the antiedematogenic activity of artemetin isolated from *Cordia curassavica*

D.C. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, p.1229-1232, 2002.

BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. **Plantas Aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial**. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 160 p, 2009.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; RESENDE C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p.588-594, 2009.

BOLZANI, V.S; VALLI, M.; PIVATTO, M.; VIEGAS JR, C. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal Chemistry. **Pure Application Chemistry**., v. 84, n. 9, p. 1837–1846, 2012.

BORSATO, A.V; DONI-FILHO, L.; CÔCCO L.C.; PAGLIA, E.C; Yield and chemical composition of essential oil of the chamomile [*Chamomilla recutita* (L.) Raeuchert] extracted for steam distillation. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 129-136, 2008.

BRASIL. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 2011. 126p.

BRASIL. **Plantas de interesse ao SUS**. Ministério da Saúde - Portal da saúde, Brasília, 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-oministerio/465-sctie-raiz/daf-raiz/cgafb-tie/fitoterapicos-cgafb/l1-fitoterapicos/12552-plantas-de-interesse-ao-sus>. Acesso em: 23 mai. 2017.

BUGNO, A.; BUZZO, A.A.; NAKAMURA, C.T.; PEREIRA, T.C.; MATOS, D.; PINTO, T.J.A. Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacológicas**. v. 41, p 491-497, 2005.

CAÑIGUERAL, S.; DELLACASSA, E.; BANDONI, A. L. Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿ indicadores de dependencia o factores de desarrollo? **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 22, n 3, p. 265-278, 2003.

CARVALHO JÚNIOR, P. M.; RODRIGUES, F. R. O.; SAWAYA, A. C. H. F.; MARQUES M. O. M.; SHIMIZU, M. T. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, v.95, n.2/3, p.297-301, Dec. 2004.

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. E.; LORENZO, N. D; DELLACASSA, E. "Steam distillation modeling for essential oil extraction process". **Industrial Crops and Products**. v.29, p.171, 2009.

CASSEL, E.; VARGAS, R.M.F. Experiments and modeling of the *Cymbopogon winterianus* essential oil extraction by steam distillation. **Journal Mexican Chemistry Sociate**, n.50, p. 126-129, 2006.

CASTRO H.G.; PERINI, V.B.M.; SANTOS G.R.; LEAL, T.C.A.L. Evaluation of content and composition of the essential oil of *Cymbopogon nardus* (L.) in different harvest times. **Revista de Ciências Agronomicas**. v.41, n.2, 2010.

CHOUDHARY, D.K.; PRAKASH, A.; WRAY, V.; JOHRI, B.N. Insights of the fluorescent pseudomonads in plant growth regulation. **Current Science**, v.97, p.170-179, 2009.

COELHO-DE-SOUZA, L.V.; LEAL-CARDOSO, J.H.; MATOS, F.J.M.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, J.P.C.; Relaxant effects of the essential oil of *E.tereticornis* on guinea-pig trachea. **Planta medica**, v.71, n. 12, p. 1773-5, 2005.

COSTA, C.M.G.R.; SANTOS, M.S.; BARROS, H.M.M.; AGRA, P.F.M.; FARIAS, M.A.A. Óleo essencial de citronela no controle da bactéria fitopatogênica *Erwinia carotovora*. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**. v.2, p.11-14, 2008.

De SMET P.A.G.M. Health risks of herbal remedies: an update. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**v. 76, p. 1-17, 2004

DRASARA, P.; MORAVCOVA, J. Recent advances in analysis of Chinese medical plants and traditional medicines. **Journal of Chromatography B**, n. 812, p. 3-21, 2004.

FAMEI, L.; ZHILI, X.; XIUMEI, L.; FENG, Q.; XIAOQIN, L. Strategy and chromatographic technology of quality control for traditional chinese medicines. **Chinese Journal of Chromatography**. n.24, p. 537-544, 2006.

FEIJÓ, E. V. R. S.; OLIVEIRA, R. A.; COSTA, L. C. B. Light affects *Varronia curassavica* essential oil yield by increasing trichomes frequency. Elsevier. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 5, p. 516-523, USA. 2014

FERNANDES E.S; PASSOS, G.F; MEDEIROS, R, CUNHA, F.M; FERREIRA, J.; CAMPOS M.M; PIANOWSKI, L.F; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology** v. 569, p. 228–236, 2007.

FERNANDES E.S; PASSOS, G.F; MEDEIROS, R, CUNHA, F.M; FERREIRA, J.; CAMPOS M.M; PIANOWSKI, L.F; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, p. 228–236, 2007.

FREITAS, M.S.M.; MARTINS, M.A.; VIEIRA, I.J.C. Produção e qualidade de óleos essenciais de *Mentha arvensis* em resposta à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.9, p.887-894, 2004.

FÜLLER, T. N. **Caracterização fenotípica, fitoquímica e molecular de populações de *Elionurus* SP. Humb. & Bompl ex Willd (capim-limão)**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). 75f.2008. Faculdade de Agronomia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2008.

GILBERT, B.; FAVORETO, R. *Cordia verbenacea* DC-Boraginaceae. **Revista Fitos**, v.7, n.1, p.17-25, 2012.

GIRARD, E.A., **Volume, Biomassa e Rendimento de Óleos Essenciais do Craveiro (*Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum) em Floresta Ombrófila Mista**. Curitiba-PR, Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, 75 f, 2005.

GIVEON S.M; LIBERMAN N.; KLANG S.; KAHAN E. Are people who use "natural drugs" aware of their potentially harmful side effects and reporting to family physician? **Patient Education and Counseling**. v.53, p. 5-11, 2004.

GOBBO-NETO, L.; LOPES N. P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**. vol.30, n. 2, 2007.

GOTTSCHLING, M.; MILLER, J.S.; WEIGEND, M. & HILGER, H.H. Congruence of a phylogeny of Cordiaceae (Boraginales) inferred from ITS1 sequence data with morphology, ecology, and biogeography. **Annals of the Missouri Botanical Garden** v.92, p.425-437, 2005.

GROSSMAN, L. **Óleos Essenciais na culinária, cosmética e saúde**. Editora Optionline, São Paulo, 301 p. 2005.

GUNTHER, E. **The Essential Oils**. New York, Van Nostrand and Co. 1948

HAGE MELIN L.I.S. **Estudo das interações entre fosfolipases A<sub>2</sub> e o inibidor vegetal, ácido rosmarínico de *Cordia verbenaceae* (Boraginaceae) cocristalização e modelagem molecular**. 2009. 171 p. Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências de Ribeirao Preto. Ribeirao Preto, 2009.

HEGNAUER, R. Chemotaxonomie der Pflanzen, v.9. Birhäuser Verlag. Stuttgart, 1990.

KOKETSU, M.; GONÇALVES, S.L. **Óleos essenciais e sua extração por arraste a vapor**. Rio de Janeiro: EMBRAPA – CTAA, 24p, 1991.

LADEIRA, S. R. **Preparação do Extrato Seco de *Cordia verbenacea***.2002. 31f. Monografia (Fitoterapia) - Porto Alegre – RS, Instituto Brasileiro de Estudos Homeopáticos - Faculdade de Ciências da Saúde de São Paulo - IBEHE/FACIS, 2002.

LARCHER,W. **Ecologia vegetal**, São Carlos: RiMa Artes e Textos, p.33-40, 2000

LEAL, P. F. **Estudo comparativo entre os custos de manufatura e as propriedades funcionais de óleos voláteis obtidos por extração supercrítica e destilação por arraste a vapor**. 2008. 275f. Tese (Doutorado em Engenharia de



Alimentos) - Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

LEAL-COSTA M. V; AMÉLIA R. P. Anatomia foliar de *Varronia curassavica* Jacq. (Cordiaceae). **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 11, n.1, p.1-118, 2017.

LIMA, H.R.P.; KAPLAN, M.A.C.; CRUZ, A.V.M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Revista Ceres**, v. 10, n.2, p.71 - 77, 2003.

LIU, M.; LI, Y.; CHOU, G.; CHENG, X.; ZHANG, M.; WANG, Z. Extraction and ultra-performance liquid chromatography of hydrophilic and lipophilic bioactive components in a Chinese herb Radix Salviae Miltiorrhizae. **Journal of Chromatography A**, n.1157, p. 51-55, 2007.

LORENZI H; MATOS FJA. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum, 2008.

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

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A. C.; GRYNBERG, N.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v.25, n.3, p.429- 438, 2002.

MAGALHÃES, P. M. de. Estratégias para o mercado de plantas medicinais e aromáticas no Brasil: o exemplo da erva-baleeira. **Informe Agropecuário, Belo Horizonte**, v.31, n.255, p.94-100, 2010.

MARTINS E.R.; CASTRO D.M.; CASTELLANI D.C.; DIAS J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 1994, 220p.

MATIAS, E.F.F; ALVES, E.F.; SANTOS, B.S; SOUZA, C.E.S.; FERREIRA, J.V.A.; LAVOR, A.K.L.S.; FIGUEREDO, F.G.; LIMA, L.F.; SANTOS, F.A.V.; PEIXOTO, F.S.N.; COLARES, A.V.; BOLIGON, A.A.; SARAIVA, R.A.; ATHAYDE, M.L.; ROCHA, J.B.T; MENEZES, I.R.A.; COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M. Biological Activities

and Chemical Characterization of *Cordia verbenacea* DC. as Tool to Validate the Ethnobiological Usage. **Journal Hindawi**. v. 2013, p. 1-7, 2013

MAUL, A.A.; WASICKY R.; BACHI, E.M. Extração por fluido supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.5, p.185-200, 1996.

MELO, J. T.; CRUZEIRO, R. L. A.; MACEDO, J. A. B.; OLIVEIRA, M. G.; TEIXEIRA, J. B. P.; BERALDO, A. F. C. A.; CASTRO, O. F. Avaliação dos níveis de contaminação microbiológica ambiental das diversas áreas de produção do Laboratório de Fitoterápicos do Programa de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Juiz de Fora. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 2, n. 2, p. 45-50, 2000.

MONTANARI JÚNIOR, I. **Variabilidade genética em uma população de *Cordia verbenacea* DC. para características agronômicas e fitoquímicas**. 2011. 77f. Tese (Doutorado em Agronomia - Horticultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

MORAIS, L. A. S. Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Org.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, cap.9, p.139-152, 2009.

MORANDI, M. A. B. Integração de métodos físicos e biológicos no controle de doenças em viveiros de plantas medicinais: estudo de caso com *Cordia verbenacea*. IN: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, p.337-341, 2009

NEVES, J. S. **Aromaterapia: Um tema para o ensino de química**, 2011, Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Química – Instituto de Química da Universidade de Brasília. Brasília - DF, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, M.G. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-177, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, M.G; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p.1022-1037, 2003.

OLIVEIRA, D.M.C.; LUCHINIA, A.C.; SEITOC, L.N.; GOMESA, J.C.; LÓPEZ, M.E.C.; DI STASI, L.C. *Cordia verbenacea* and secretion of mast cells in different animal species. **Journal of Ethnopharmacology**, v.135, p. 463–468, 2011.

PASSOS, G.F.; FERNANDES, E.S.; CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L.F.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**. n.110, p.323–333, 2007.

PEREIRA C.G; MEIRELES, M.A.A. Economic analysis of rosemary, fennel and anise essential oils obtained by supercritical fluid extraction. **Flavour and Fragrance Journal**, v.22, p.407-413, 2007

PEREIRA, J.A.S. ***Cordia verbenacea* DC.: perfil morfo-anatômico, histoquímico, farmacognóstico e avaliação da atividade anti-candida do extrato hidroetanólico e suas frações**. 2013. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP, Araraquara, SP, 2013.

PIANOWSKI, L. Primeiro fitomedicamento baseado em planta brasileira é um antiinflamatório. **Jornal Fyotomédica**, v.1, n.1, p.2-3, 2005.

PORTAL BRASIL. **Ministério da Saúde**. Uso de plantas medicinais e fitoterápicos sobe 161%. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2016/06/uso-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-sobe-161>>. Acesso em: 20 maio 2017.

QUISPE-CONDORI, M.A. et al. Obtaining  $\beta$ -caryophyllene from *Cordia verbenacea* de Candolle by supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 46, p. 27-32, 2008

RAPISARDA, A.; LAUK, L.; RAGUSA, S. Micromorphological study on leaves of some *Cordia* (Boraginaceae) Species used in traditional medicine. **Economic Botany**, v.51, n.4,p.385-391, 1997.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. & EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6°ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 906p, 2001

ROCHA, L.; SOARES, M.M.S.R.; CORRÊA, C. L . Análise da contaminação fúngica em amostras de *Cassia acutifolia Delile* (sene) e *Peumus boldus* (Molina) *Lyons* (boldo-do-Chile) comercializadas na cidade de Campinas, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacológicas**. v.40, p.521-527, 2004.

RODRIGUES, F.F.G.; OLIVEIRA, L.G.S.; SARAIVA, M.E.; ALMEIDA, S.C.X.; MARIO E. S.; CAMPOS, A.R.; COSTA, J.G.M. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. **Pharmacognosy Research** , v.4 , n. 3, 2012

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D.A. de. **Plantas medicinais no domínio dos Cerrados**. Lavras: UFLA, 2001. 180p.

SANTOS, J. C. **Extração com fluido supercrítico e suas aplicações na obtenção de produtos naturais**. 2011. 40 f. Trabalho de conclusão de curso em Farmácia. Faculdade de Farmácia- Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRS.

SANTOS, M.R.A.; FERNANDES, C.F.; INNECO, R. Efeitos da adubação orgânica na produção de biomassa e óleo essencial de *Lippia alba*. **Folhetos da EMBRAPA**. 2006.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabolites secundarios. In: SIMOES, C. M O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre, UFSC, p.403-434, 2007

SANTOS, S.C.; FERREIRA, F.S.; ROSSI-ALVA, J.C.; FERNANDEZ, L.G. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p. 215-219, 2007.

SARTOR, R.B. **Modelagem, simulação e otimização de uma unidade industrial de extração de óleos essenciais por arraste a vapor**. 2009. 99f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS.

SEIGLER, D.S.; MIKOLAJCZAK, K.L; SMITH JR. C.R; WOLFF I.A. Structure and reactions of a cyanogenetic lipid from *Cordia verbenacea* DC. Seed oil. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.4, p.147-161, 1970

SERAFINI, L.A.; SANTOS, A.C.A.; TOUGUINHA, L.A.; AGOSTINI, G.; DALFOVO, V. **Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002.

SERTIE, J.A.A.; BASILE, A.C.; PANIZZA, S.; MATIDA, A.K; ZELNIK, R. Antiinflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetina. **Planta médica**, v56, p.36-40, 1990.

SILVA JÚNIOR, A.A., VIZZOTO, V.J., GIORGI, E., MACEDO, S.G.; MARQUES, L.F. **Plantas medicinais: caracterização e cultivo**. Boletim técnico nº 68. Florianópolis: EPAGRI, 1995. 71 p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Da Universidade Federal de Santa Catarina, 2010, 1102 p.

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

SIMÕES, C.M.O. & SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. PortoAlegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, p. 387-415, 1999.

SIMÕES, O.M.C.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Da Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 3. ed., 323-354, 2001.

SOUZA, M.R.M.; PEREIRA, R.G.F.; FONSECA, M.C.M. Comercialização de plantas medicinais no contexto da cadeia produtiva em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v.14, p.242-245, 2012.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; SALGADO, H.R.N.; PIETRO, R.C.L.R. Brazil in the context of plants and derivatives quality control. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.3, 2010.

STAPF, M. N. S. **Varronia in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB105435>>. Acesso em 21 maio 2017.

STEFFANI, E. **Modelagem matemática do processo de extração supercrítica de óleo essencial de Ho-Sho (Cinnamomum camphora Nees & Eberm var. linaloolífera Fujita) Utilizando CO<sub>2</sub>**. 106f. 2003. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed. 2009.

THOLL D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Curr. Opin. Chemistry & Biology* v.9, p.297–304, 2006.

TÖLKE, E. E. A. D.; MELO, J. I. M.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; LACCHIA, A. P. S. Leaf anatomy with emphasis on separation of two species of *Varronia* P.Br. (Cordiaceae) of the Brazilian semi-arid region. Springer. **Brazilian Journal of Botany**, v. 36, n. 3, p. 189-201, USA. 2013.

VALÉCIO. M. Avanço dos fitomedicamento. Guia da Farmácia. Disponível em: <<http://www.guiadafarmacia.com.br/286-setembro-2016-opcao-de-escolha/11002-saida-natural>>. Acesso em 22 maio 2017.

VAZ, A. P. A.; SCARANARI, C.; BATISTA, L. A. R.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; MAGALHÃES, P. M. Biomassa e composição química de genótipos melhorados de espécies medicinais cultivadas em quatro municípios paulistas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.5, p.869-872, 2006.

VENTRELLA, M.C; MARINHO, C.R. Morphology and histochemistry of glandular trichomes of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) leaves. **Revista Brasileira de Botânica.**, v.31, n.3, p.457- 467, 2008.

VERPOORTE, R & MARASCHIN, M. Engenharia do Metabolismo de Plantas Mediciniais. In: YUNES, R.A. & CALIXTO, J.B. (eds.): **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna.** Campus Chapecó, Santa Catarina: Argos- Ed. Universitária UNOESC, p. 381-432, 2001

WOLFFENBUTTEL, A.N. **Base da química dos óleos essenciais e aromaterapia: abordagem técnica e científica.** São Paulo: Roca, 2010.

YUSOFF, Z. M.; NORDIN, M. N. N.; RAHIMAN, M. H. F.; ADNAN, R.; TAIB, M. N. Characterization of Down-Flowing Steam Distillation System using Step Test Analysis. **IEEE CSGRC**, p. 197-201, 2011.

## **2. CAPITULO II: ARTIGO**

---



**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL  
DE ERVA-BALEEIRA (*Varronia curassavica* Jacq.) SOB A INFLUÊNCIA DA  
IDADE DA PLANTA.**

Jéssica Pires Farias<sup>a</sup>, Alyne R. Araújo-Nobre<sup>a</sup>, Cristina D. Ropke<sup>b</sup>, Daniel D.R.  
Arcanjo<sup>c</sup>, Enoque P.C. Sobrinho-Júnior<sup>c</sup>, Fernando A.A. Carvalho<sup>c</sup>, Ivanilza M.  
Andrade<sup>e</sup>, Klinger A.F. Rodrigues<sup>c</sup>, Michel M.M. Aves<sup>c</sup>, Francisco A.S. Filho<sup>d</sup>, José  
Roberto de S.A. Leite<sup>f</sup>

<sup>a</sup> Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, Biotec, Campus Ministro Reis Velloso Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, PI, Brasil

<sup>b</sup> Phytobios LTDA, Barueri, São Paulo, SP, Brasil

<sup>c</sup> Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil

<sup>d</sup> Programa de pós-graduação em química, Universidade Estadual do Piauí, Parnaíba, PI, Brasil

<sup>e</sup> Laboratório de células e moléculas, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, PI, Brasil

<sup>f</sup> Faculdade de Medicina, Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Distrito Federal, DF, Brasil

## RESUMO

*Varronia curassavica* Jacq. (Boraginaceae) é uma espécie popularmente conhecida como erva-baleeira e possui atividades biológicas bem descritas na literatura etnofarmacológica. Mediante a confirmação da atividade anti-inflamatória do seu óleo essencial através da identificação dos sesquiterpenos alfa-humuleno e trans-cariofileno, viabilizou-se a produção do primeiro fitomedicamento produzido no Brasil, o Acheflan®. A influência da idade da planta no momento da colheita sobre a produção de óleo essencial vem sendo estudada em diferentes plantas aromáticas. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da idade da planta nos constituintes do óleo essencial de *V. curassavica* extraídos em escala industrial e averiguar as atividades antimicrobiana e citotóxica, investigando se a diferença de idades também interfere nessas respostas. Foi realizado como parte adicional ao trabalho um perfil anatômico da espécie cultivada no acesso do estudo. Partes aéreas de erva-baleeira foram colhidas com 4 meses de idade (amostra A), 10 meses (amostra B), 1 ano e 2 meses (amostra C) e 1 ano e 6 meses de idade (amostra D) para a extração dos óleos essenciais. A composição química dos óleos foi obtida por Cromatografia Gasosa acoplada a espectrômetro de Massas (GC-MS). Ferramentas quimiométricas como a análise de componentes principais (ACP) e componentes hierárquicos (ACH) foi utilizada para diferenciação das amostras. Os ensaios antimicrobianos foram realizados pelo método de determinação da concentração inibitória mínima (CIM). O ensaio de citotoxicidade foi determinado pelo método colorimétrico MTT (Brometo de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)]. A análise macroscópica da espécie permitiu identificar que se trata de um arbusto, de 1,5 metros de altura, ramos cilíndricos, com presença de lenticelas e glândulas nos ramos jovens. Na análise microscópica foi possível verificar que a superfície adaxial da folha possui células epidérmicas irregulares, e variedade na quantidade de tipos de tricomas. Os principais constituintes do óleo essencial do estudo são o  $\alpha$ -pineno, trans-cariofileno e alloaromadendreno. Os resultados obtidos da quantificação dos principais constituintes do óleo mostraram diferença significativa na sua composição quando extraído da planta em diferentes idades. O teor de alfa-humuleno foi superior para a amostra C (3,02%), enquanto o trans-cariofileno e o alfa-pineno tiveram teores superiores na amostra B com teores de 10,10% e 63,87% respectivamente. Uma menor quantidade de alfa-humuleno e alfa-pineno foram encontrados na amostra A, com teores de 2,04% e 28,03% e o trans-cariofileno foi encontrado em menor quantidade na amostra D com 4,38%. A ACP e ACH diferenciaram as amostras de acordo com as substâncias que mais contribuem para a sua caracterização. Os resultados advindos da atividade antibacteriana demonstraram que para as estirpes utilizadas não houve inibição visível de crescimento até a concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$ . A atividade antifúngica apresentou uma CIM igual a 1000  $\mu\text{g/mL}$ . A idade da planta pareceu não influenciar na resposta antimicrobiana das amostras. A atividade citotóxica foi maior para a amostra A ( $\text{CC}_{50}$  47,99  $\mu\text{g/mL}$ ), seguida das amostras B ( $\text{CC}_{50}$  60,22  $\mu\text{g/mL}$ ), C ( $\text{CC}_{50}$  73,18  $\mu\text{g/mL}$ ) e D ( $\text{CC}_{50}$  171,90  $\mu\text{g/mL}$ ). Os resultados encontrados sugerem que a idade da planta influenciou tanto na composição química quanto na atividade citotóxica dos óleos essenciais extraídos de *V. curassavica*.

**Palavras chave:** Cordia, metabolismo, compostos químicos, farmacologia

## 1. INTRODUÇÃO

A investigação de princípios bioativos advindos do metabolismo secundário de vegetais superiores tem sido de grande valia na produção de novos medicamentos à base de produtos naturais. Atuam como alternativas terapêuticas ao mercado farmacêutico atual e como incremento de produtos já consagrados na indústria cosmética e alimentícia (MONTANARI E BOLZANI, 2001; NEWMAN; CRAGG, 2004).

Tais substâncias possuem funções biológicas de defesa do vegetal e ataque a patógenos e representam uma interface química entre a planta e o ambiente, sendo sua biossíntese coordenada e alterada tanto por fatores genéticos quanto pela influência de variáveis bióticas e abióticas presentes em seu local de cultivo. Dessa maneira, plantas pertencentes à mesma espécie cultivadas em distintos acessos podem apresentar composições químicas diferentes (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; BARROS et al., 2009).

*Varronia curassavica* Jacq. (Boraginaceae) é uma espécie popularmente conhecida como erva-baleeira, nativa do litoral brasileiro e encontrada nos estados do Ceará, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e São Paulo (LADEIRA, 2002). Constitui-se como um arbusto aromático de folhas alternas, utilizado na medicina popular sob a forma de chá para o tratamento de contusões, dores musculares e empregado como analgésico e cicatrizante (LORENZI; MATOS, 2008).

As atividades biológicas das diferentes partes da planta são bem descritas na literatura etnofarmacológica como antimicrobiana, anti-helmíntica (MATHIAS et al., 2015), analgésica, antiúlcera e anti-inflamatória (VENTRELLA et al., 2008). No Brasil, o Ministério da Saúde divulgou no ano de 2009, a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) contendo 71 espécies de plantas medicinais com potencial para gerar produtos com fins terapêuticos, e a erva-baleeira é uma das plantas pertencentes a essa lista (PORTAL BRASIL, 2016).

Após anos de estudos e investimentos em pesquisas envolvendo a espécie, verificou-se que essa atividade estava relacionada à presença de compostos químicos de baixa polaridade, os quais poderiam estar presentes no óleo essencial (CARVALHO JÚNIOR et al., 2004). Mediante confirmação da atividade farmacológica através da identificação dos sesquiterpenos alfa-humuleno e trans-cariofileno

(FERNANDES et al., 2007), viabilizou-se a produção do primeiro fitomedicamento produzido no Brasil à base de óleo essencial de *V. curassavica*, presente na forma de creme e aerossol, com o nome comercial Acheflan® (BR 102015012438-4 A2). Esse medicamento, após aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA), tem sido enviado aos Estados Unidos, Canadá e ao Japão (BOLZANI et al., 2012).

No que concerne à espécie *V. curassavica*, distintas pesquisas foram desenvolvidas com o intuito de se averiguar a influência de variáveis no teor e na constituição do óleo essencial. Dentre elas pode-se destacar: sazonalidade (PEREIRA, 2017), horário de coleta (QUEIROZ et al., 2016), orientação geográfica e dossel (SOUZA et al., 2009), adubação orgânica e rebrota (CAPAZ, 2017), temperatura de secagem (GONELI et al., 2014), pré-tratamento com ultrassom (SOUZA, 2016) e sombreamento (GOMES, 2007).

A influência da idade da planta no momento da colheita sobre a produção de óleo essencial também vem sendo estudada em diferentes plantas aromáticas, como *Lippia sidoides*, *Porophyllum ruderale*, *Lippia alba*, *Cymbopogon citratus* e *Mentha arvensis* (SANTOS; INNECCO, 2004; FONSECA et al., 2007; PINTO 2017), apresentando respostas diferenciadas para cada espécie. Nesse contexto, entender a interferência dessa variável na constituição química do óleo essencial da erva-baleeira, poderá auxiliar na otimização da sua produção.

Dessa maneira, este estudo teve como objetivo avaliar a influência da idade da planta nos constituintes do óleo essencial de *V. curassavica*, com ênfase nos terpenos alfa-pineno, trans-cariofileno e alfa-humuleno. Além disso, objetivou-se averiguar as atividades biológicas do óleo, bem como, determinar se a diferença quantitativa de seus componentes nas diferentes idades interfere em seu potencial farmacológico. Como complemento do trabalho, foi realizada uma caracterização anatômica das folhas e do caule da planta para se obter um perfil da espécie cultivada na área onde o estudo foi realizado.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Aspectos éticos**

O desenvolvimento do estudo foi realizado através de parceria estabelecida entre a Universidade Federal do Piauí-UFPI e as empresas Phytobios Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação LTDA e o Grupo Centroflora Anidro do Brasil. As informações metodológicas de produção do óleo essencial são de propriedade intelectual da indústria e por isso não serão descritas neste trabalho.

### 2.1.1 Localização e descrição da área de estudo

Os experimentos foram realizados na área de produção agrícola do Grupo Centroflora Anidro do Brasil, localizada no Distrito de Irrigação Tabuleiros Litorâneos, Parnaíba, Piauí. Essa unidade agrícola é responsável pela produção orgânica para a extração de óleos essenciais e alcaloides, incluindo o plantio de espécies vegetais como *Azadirachta indica* A. Juss (Nim), *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm. (Jaborandi) e *Varronia curassavica* Jacq. (Erva-baleeira).

O plantio de *Varronia curassavica* Jacq localiza-se na área do pivot central com 59.8 hectares de cultivo, dividido em subáreas denominadas talhões, que são enumerados e diferenciados uns dos outros de acordo com sua data de plantio. A área selecionada para o desenvolvimento do projeto corresponde ao Talhão 13, de coordenadas geográficas: latitude 3° 1,720' S e longitude 41° 45.021'O, e dimensão de 3,34 hectares.

## 2.2 Material vegetal e extração dos óleos essenciais

O plantio do das mudas em campo foi realizado em março do ano de 2016. O material botânico utilizado para a produção do óleo essencial em escala industrial consistiu em partes aéreas de erva-baleeira colhidas de forma mecanizada com o auxílio de uma colhedeira de forragem que realizava de forma instantânea a picotagem da planta. A altura de corte foi padronizada em 0,3 m acima do solo.

As respectivas colheitas do material vegetal foram realizadas seguindo cronograma estabelecido pela empresa, sendo a primeira realizada em setembro de 2016 e as seguintes em março, julho e novembro do ano de 2017, com intervalo mínimo de quatro meses entre um corte e outro. Após a colheita, o material foi designado para o processo de extração.

A destilação foi efetuada por meio de um modelo de extração por arraste a vapor em escala industrial por um período de duas horas. As partes aéreas de erva-baleeira foram depositadas em dorna de aço inoxidável, uniformemente distribuídas e compactadas por meio de pisoteio. Alíquotas de cada óleo essencial produzido utilizando como matéria prima o talhão 13 foram cedidas ao término do período de extração.

O óleo essencial produzido no mês de setembro de 2016, com 04 meses de idade, foi identificado como amostra A. As amostras obtidas nos meses de março, junho e novembro de 2017 com idades de 10 meses, 1 ano e 2 meses e 1 ano e 6 meses foram identificadas como amostras B, C e D, respectivamente. Após identificação, o material foi armazenado em ambiente refrigerado para posterior análise química e realização de atividades biológicas.

O cálculo de rendimento dos óleos foi feito com base na matéria fresca da amostra coletada e no peso do óleo obtido. A fórmula utilizada para o cálculo do rendimento:

$$R(\%) = (MO \div M) \times 100$$

Onde: **R** = Rendimento de óleo essencial; **MO** = Massa do óleo essencial (g); **M** = Massa do material vegetal (g).

## 2.3 Aspectos botânicos

### 2.3.1 Caracterização anatômica das folhas e caule de *V.curassavica*

Partes aéreas do talhão 13 foram coletadas e destinadas à análise anatômica no laboratório de células e moléculas da Universidade Federal do Piauí-UFPI. Exemplos da espécie também foram coletados e destinados para a preparação de exsicata que se encontra depositada no Herbário Delta do Parnaíba (HDELTA), localizado na UFPI com número de registro 3930.

As análises macroscópicas foram realizadas com o auxílio de uma lupa. Levou-se em consideração características como tamanho, cor, odor e sabor. As estruturas analisadas foram folhas, flores, frutos e inflorescência. As análises

microscópicas por sua vez, foram feitas lâminas com cortes a mão livre, paradérmicos e cortes transversais do caule e da nervura mediana da folha (OLIVEIRA, 1998). As amostras foram clarificadas com hipoclorito de sódio a 2% e posteriormente coradas com safranina a 0.5 %. Os tecidos foliares foram observados ao microscópio óptico e as estruturas visualizadas foram fotografadas.

## 2.4 Análises químicas

### 2.4.1 Composição química dos óleos essenciais

As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas para identificação e quantificação dos componentes químicos farmacologicamente ativos dos óleos. Os experimentos foram realizados no laboratório da empresa Phytobios Pesquisa Desenvolvimento e Inovação LTDA.

Utilizou-se sistema cromatográfico acoplado a espectrômetro de massas com ionização por impacto de elétrons (GC-MS-QP210 SE, Shimadzu, Japão). Foi utilizada uma coluna capilar a Equity <sup>TM</sup>-1, equivalente a HP-1 de 60 m x 0,25 mm x 1 µm (Supelco) seguindo a programação da temperatura de 100 °C a 240 °C (5°C min<sup>-1</sup>) permanecendo por 5 minutos, seguido de aquecimento de 240 a 280 °C (10 °C/min<sup>-1</sup>) pelo mesmo período de permanência. O gás inerte utilizado para análise foi hélio a 1 mL min<sup>-1</sup> razão de Split 1:10 e volume injetado de 1 µL. O injetor foi mantido a 250°C e o detector a 280°C. Para o espectrômetro de massas foram utilizadas as seguintes condições: temperatura da fonte de íons: 200°C; temperatura da interface: 290°C; tempo de delay de 5 min; Modo de análise: scan (35-350 m/z). A identificação dos constituintes dos óleos essenciais de erva-baleeira foi feita através da comparação dos espectros de massas com o da biblioteca NIST 14, pelo tempo de retenção obtido através da injeção direta dos padrões analíticos de α-pineno, trans-cariofileno, e α-humuleno e pelo índice de Kovats, calculado para cada constituinte que foi comparado com o tabelado de acordo com a literatura (ADAMS, 2007).

A quantificação foi realizada com metodologia de uso de padrão analítico e padrão interno. O padrão interno utilizado foi o composto dibutilftalato e os padrões analíticos o alfa-humuleno, trans-cariofileno e alfa-pineno. Foram construídas curvas

de calibração utilizando os diferentes padrões analíticos para cada amostra de óleo essencial produzida. O teor das substâncias foi expresso em porcentagem.

A formula utilizada foi:

$$\text{(\% substância)} = \frac{\text{RA amostra} \times \text{M padrão} \times \text{P padrão} \times \text{D amostra} \times 100}{\text{RA padrão} \times \text{D padrão} \times \text{M amostra}}$$

Onde: **RA amostra**= razão entre as áreas da substância e dibutilftalato na amostra; **M padrão** = massa do padrão em g; **P padrão**= pureza do padrão em decimal; **D amostra**= diluição da amostra, em mL; **RA padrão**= média da razão entre as áreas da substância e do dibutilftalato no padrão; **D padrão** = diluição do padrão, em mL; **M amostra**= massa da amostra, em gramas.

#### 2.4.2 Análise Estatística Multivariada

A análise estatística multivariada foi realizada para examinar a variabilidade da composição química entre as amostras de óleos essenciais extraídos de *V.curassavica* em diferentes idades. Foi utilizado o software *Pirouette- Infometrix* versão 3.11 para a Análise dos Componentes Principais (PCA) e Análise dos Componentes Hierárquicos (HCA).

Os valores de porcentagem em área (%) extraídos dos dados obtidos pela análise feita em Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (GC-MS) foram convertidos em um arranjo matricial de dados (4 amostras x 27 variáveis) para a construção dos gráficos de PCA. A metodologia utilizada foi a centrada na média, com rotação normal e máximo de fatores igual a 3. Para a realização das análises de HCA foram utilizados a distância euclidiana e o método centrado na média.

## 2.5 Atividades biológicas

### 2.5.1 Avaliação da atividade antibacteriana



Os ensaios antimicrobianos foram realizados no laboratório de microbiologia da Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso. Para estudar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais, cinco linhagens foram selecionadas para realização da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) segundo metodologia empregada pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* - CLSI para bactérias de interesse clínico (2012). As cepas utilizadas foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus MRSA* (ATCC 43300), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Todas foram reavivadas em ágar Mueller Hinton e incubadas por 24 horas a 37 °C. Para o desenvolvimento do estudo, suspensões dos microrganismos foram preparadas em solução salina 0.85% p/v, sob a concentração  $1-2 \times 10^8$  UFC/mL, equivalente ao 0,5 da escala de McFarland. As leituras de turbidez foram realizadas utilizando espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800), no comprimento de onda de 625 nm. A solução mãe dos óleos essenciais foi preparada com DMSO a 10% em água.

O experimento foi delineado utilizando placas de microdiluição de 96 poços com caldo Mueller-Hinton inoculado com as respectivas bactérias ( $5 \times 10^5$  UFC/mL) e concentrações dos óleos essenciais variando de 1000 a 7,8 µg/mL. As placas foram incubadas durante 24 h a 37 °C em condições aeróbicas. A CIM foi definida como a menor concentração de amostra que restringiu o crescimento bacteriano visualmente. O ensaio foi realizado em triplicata.

### 2.5.2 Avaliação da atividade antifúngica

O fungo leveduriforme utilizado para a avaliação da atividade antifúngica foi *Candida albicans*. A suspensão do microorganismo foi preparada em solução salina, sob a concentração  $1-3 \times 10^6$  UFC/mL, equivalente ao 0,5 da escala de McFarland. As leituras de turbidez foram realizadas utilizando espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800), no comprimento de onda de 530 nm. As amostras de óleo essencial também foram preparadas com DMSO a 10% em água. O fungo numa concentração de  $10^3$  UFC/mL foi inoculado no caldo RPMI 1640 tamponado com MOPS e adicionou-se concentrações dos óleos essenciais variando de 1000 a 7,8 µg/mL. O ensaio foi

realizado em triplicata. As placas foram incubadas durante 24 h a 37 °C em condições aeróbicas.

### 2.5.3 Avaliação do efeito dos óleos essenciais sobre a viabilidade celular de macrófagos peritoneais murinos

#### 2.5.3.1 Animais

Foram utilizados 10 camundongos BALB/c machos (20 – 30 g) mantidos em sala climatizada em temperatura de 24-25 °C, ciclo claro-escuro de 12 horas e livre acesso à alimentação e água. Os experimentos propostos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animal da UFPI (Parecer Nº 327/17). Os procedimentos referentes à eutanásia dos animais estarão em conformidade com a Resolução 1000 de 11 de maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Assim, os animais foram eutanasiados com lidocaína 10mg/kg + tiopental sódico 100mg/kg (i.p.). Os cadáveres foram embalados em saco plástico e colocados em freezer destinado para esse fim. Após avaliação, os mesmos foram enviados para a empresa Ecoservice, gerenciamento e tratamento de resíduos Ltda, responsável pela incineração. Esse experimento foi realizado no Laboratório de Atividade Antileishmania (LAA) do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí (NPPM-UFPI).

#### 2.5.3.2 Obtenção de macrófagos peritoneais murinos

Os macrófagos utilizados neste trabalho foram obtidos da cavidade peritoneal dos animais descritos no item 2.5.3.1. Após eutanásia realizada, foram mantidos em álcool a 70% para a retirada dos macrófagos que foi feita em capela de fluxo laminar, com os animais fixados em placa de cortiça na posição de decúbito dorsal, administrando-se 6 mL de salina tamponada com fosfato (PBS – NaCl 145 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, pH 7,4), estéril, a 4°C, na cavidade abdominal. Em seguida foi feita uma massagem suave na região abdominal e realizada a aspiração do PBS injetado utilizando-se uma agulha acoplada a uma seringa estéril. O material obtido foi transferido para um tubo cônico de poliestireno com capacidade de 50 mL,

centrifugado a 1.000 rpm durante 10 min a 4 °C. O material foi lavado três vezes com PBS estéril na temperatura de 4°C. Para averiguação da viabilidade celular, as células foram diluídas em corante azul de Trypan (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e foi realizada avaliação da integridade celular e contagem de células em Câmara de Neubauer.

#### 2.5.3.3 Citotoxicidade

Para a realização do ensaio de MTT, os macrófagos foram semeados a uma densidade de  $2 \times 10^5$  células em meio RPMI numa placa de 96 poços durante um período de 4 h a 37 ° C. As células foram lavadas duas vezes com RPMI e tratadas com as amostras dos óleos essenciais em DMSO 1% em concentrações variando de 800 a 6,25 µg / mL. O DMSO foi usado como controle. As placas foram incubadas durante 48 h a 37 ° C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação as células foram tratadas com 10 µL de MTT diluído em meio RPMI numa concentração de 5 mg/mL durante 4 h a 37 ° C. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 µL de DMSO a cada poço. As placas foram agitadas durante cerca de 30 min em um agitador Kline (modelo AK 0506) à temperatura ambiente até completa dissolução dos cristais de formazan. A absorbância das amostras foi medida num comprimento de onda de 550 nm usando um leitor de placas. (ALVES et al., 2017).

#### 2.5.3.4 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software Graphpad Prism (versão 6.1) (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Para o cálculo das médias de teor de óleo essencial foi aplicado o teste t de student com nível de significância para  $p < 0.05$ . Uma Análise de variância ANOVA foi utilizada para averiguar se houve diferença significativa estatística das substâncias quantificadas no óleo essencial advindo de plantas com diferentes idades.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Aspectos botânicos

A identificação botânica de espécies vegetais, principalmente quando se trata de plantas medicinais, deve ser realizada da forma mais correta e precisa possível. Deve-se ter certeza da denominação correta da espécie da qual estão sendo extraídas as substâncias bioativas que serão indicadas para uso terapêutico, uma vez que cada material vegetal apresenta características peculiares, e, por isso, os princípios ativos de cada uma apresentarão diferenças que causam efeitos diversos (MARTINS-DA-SILVA, 2002).

Em termos taxonômicos, *Varronia curassavica* Jacq. foi revista por especialistas botânicos que possuíam algumas divergências quanto a divisão da família Boraginaceae e seus respectivos gêneros por conta de diferenças morfológicas das plantas enquadradas como pertencentes a eles (Vieira et al., 2013). De sinônimo *Cordia verbenacea*, esta espécie é atualmente classificada pela maioria dos taxonomistas como pertencente ao gênero *Varronia* e não mais ao gênero *Cordia*, por apresentar características anatômicas distintas como a presença de inflorescências condensadas em forma de espiga (MILLER; GOTTSCHLING 2007).

##### a) Macroscopia

O estudo anatômico de uma planta é de fundamental importância para a correta identificação da espécie, uma vez que os marcadores anatômicos podem ser utilizados para diferenciação de matérias-primas vegetais submetidas ao controle de qualidade.

A análise macroscópica da espécie permitiu identificar que a espécie se trata de um arbusto, ca1,5 m altura, de ramos cilíndricos, com presença de lenticelas, de glândulas nos ramos jovens e pubescentes.

Sua folha é simétrica, alterna espiralada; pecíolo 0,7×0,3 cm; lâmina 5-11×1,5-3 cm, decolor, de limbo lanceolado, de ápice agudo, base decorrente e margem irregularmente denteada; face adaxial tomentosa com presença de glândulas, face

abaxial com inervação proeminente. A inflorescência é racemosa do tipo espiga, 12-18 cm de comp., pedúnculo ca. 4-7,5 cm comp.

**Figura 1.** Macroscopia de *V. curassavica*. Fruto (A); Superfície adaxial da folha (B); Superfície abaxial (C); Flores (D).



As flores por sua vez, são congestas, de corola branca de 06 pétalas, campanulada, com 06 estames, 06 sépalas esverdeadas 4x3 mm, gamossépala pubescente, gamopétala pubescente nas faces internas e externas e cálice verde; ovário supero 1x1 mm tricarpelar, estilete 3 mm e 3 estigmas; óvulo gamocarpelar, unilocular. Por fim, o fruto é do tipo drupáceo 0,7x0,8 cm, de coloração avermelhada e semente única ornamentada. As colorações encontradas foram: caule verde, folha

bicolor, verde mais escuro na face adaxial, flor branca e fruto avermelhado. A planta inteira possui odor forte e persistente e *sabor* não observado.

## **b) Microscopia**

Os dados obtidos através da análise microscópica permitiram a identificação de estruturas encontradas tanto na folha quanto no caule.

A superfície adaxial da folha possui células epidérmicas irregulares, e presença de glândulas de aporte de óleo essencial. Ocorrem nessa face dois tipos distintos de tricomas. O primeiro é um tricoma curto de forma cônica, que segundo Leal-Costa (2017) é responsável por conferir aspereza às folhas da família Boraginaceae, e o segundo, trata-se de um tricoma glandular vesiculoso de cabeça globular e base constituída por 3 a 4 células. Não foi verificada a presença de estômatos. A superfície abaxial por sua vez é caracterizada pela abundância em tricomas tectores de uma única célula longa e afiada, além da presença de estômatos, sendo assim caracterizada como hipoestomática.

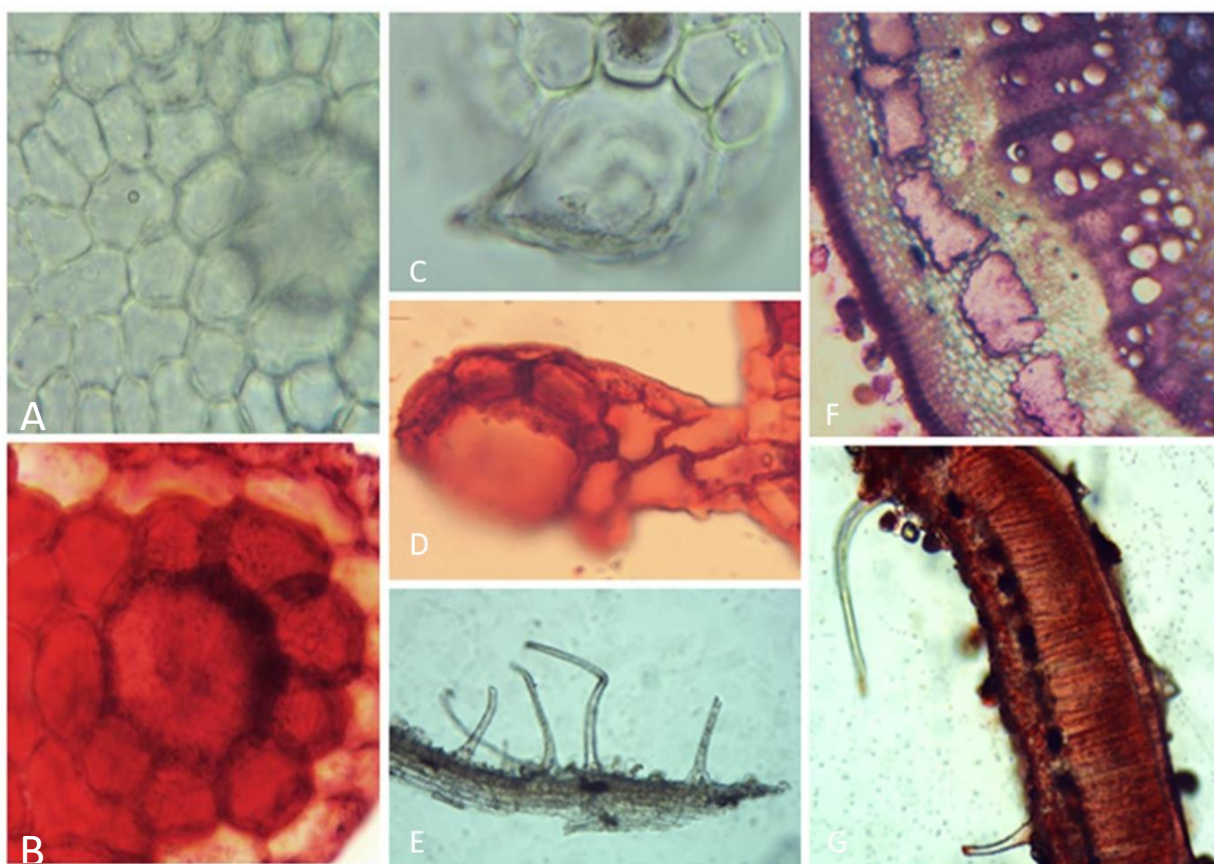
Os resultados encontrados através da análise das características anatômicas das folhas *V.curassavica* são corroborados com a literatura de estudos anatômicos realizados com a mesma espécie cultivada em outros acessos. Ventrella e Marinho (2008) ao investigar a morfologia e histoquímica dos tricomas glandulares de folhas de erva-baleeira, também encontraram diversas morfologias dessas estruturas, incluindo tricomas tectores unicelulares, cônicos, alongados e pontiagudos na parede celular.

Os tricomas são apêndices epidérmicos que atuam na defesa da planta no combate a herbívoros e estão intimamente ligados ao aumento da reflexão de raios solares, diminuindo a temperatura foliar e conseqüentemente sua perda de água por evaporação (EVERT, 2013). Além disso podem ser utilizados com propósitos taxonômicos e suas distintas morfologias podem ser utilizadas como uma das características diferenciais entre as espécies desse gênero (DEMÉTRIO, 2017).

O corte transversal do caule permitiu a observação de tecidos perfeitamente diferenciados. A epiderme é uniestratificada, com a presença de tricomas. A região cortical é homogênea com visualização clara do esclerênquima. O sistema vascular é circular e fechado e as células da medula são homogêneas. Resultados similares

foram encontrados por Pereira (2013), que realizou o perfil morfo-anatômico, histoquímico, farmacognóstico e a avaliação da atividade anti-candida do extrato hidroetanólico e frações de folhas de erva-baleeira cultivada em São Paulo.

**Figura 2.** Fotomicrografia da folha de *V.curassavica*. Corte longitudinal da superfície adaxial: células epidérmicas de caráter irregular (A). Corte longitudinal da superfície adaxial: glândula de aporte de óleo essencial (B). Tricoma tector cônico com sistólico na base (C). Tricoma glandular com pé composto por 3 a 4 células (D). Corte transversal do caule com foco no esclerênquima (E). Corte transversal da folha, com presença e pelos na superfície abaxial (F). Corte longitudinal da superfície abaxial (G).



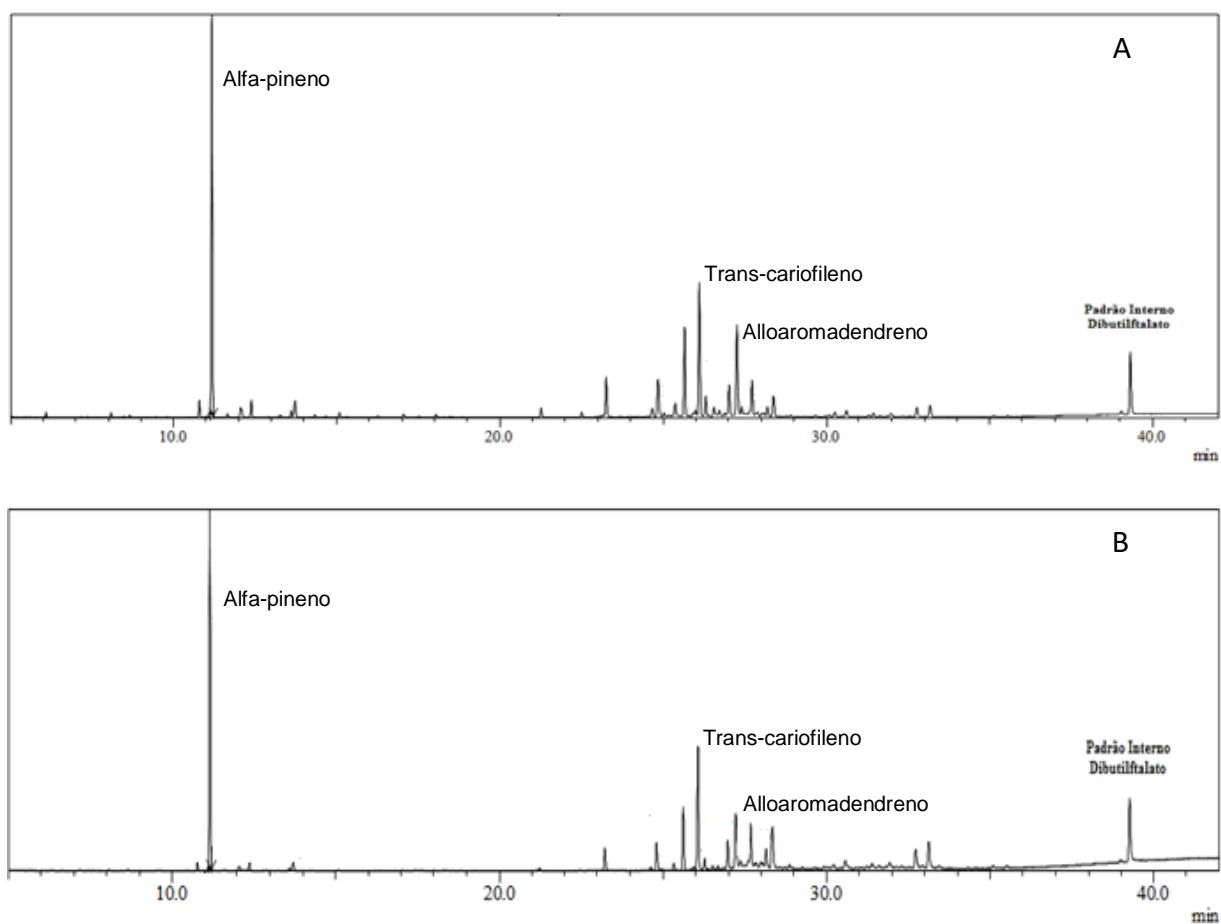
### 3.2 Análise qualitativa dos óleos essenciais

A produção de metabólitos secundários pode variar de acordo com o seu ciclo reprodutivo, as rotas metabólicas determinadas pelo efeito de hormônios, sazonalidade e idade da planta (BROWN JÚNIOR et al., 1988). No presente

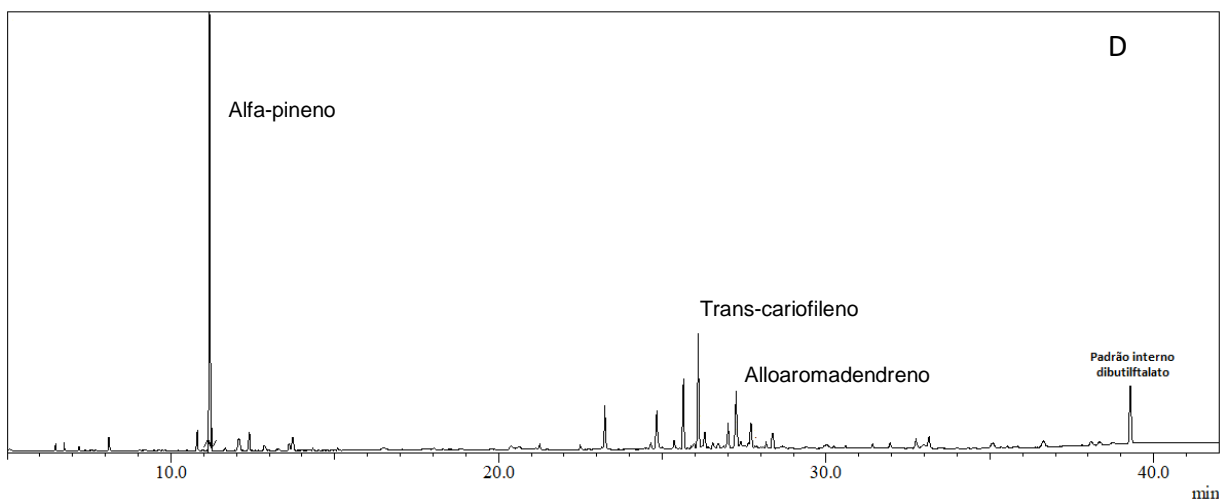
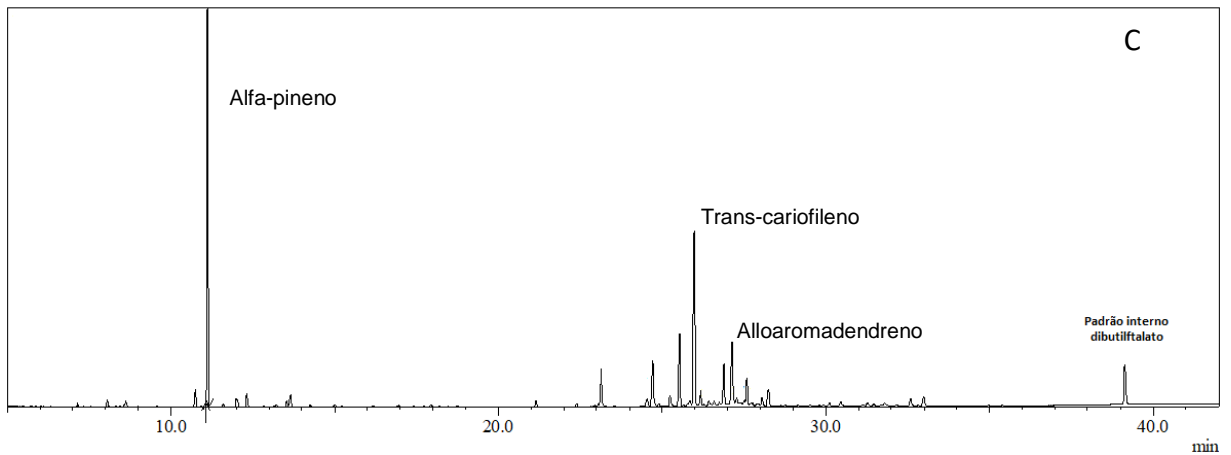
estudo a composição química dos óleos essenciais de *V. curassavica* foi investigada por meio da análise por GC-MS. A Figura 3 mostra os cromatogramas obtidos para as amostras A, B, C e D. A Tabela 1 traz os componentes que foram identificados.

Através dos cromatogramas obtidos foi possível verificar que os principais constituintes do óleo essencial de *V. curassavica* cultivado no acesso do estudo são o  $\alpha$ -pineno, trans-cariofileno e alloaromadendreno.

**Figura 3.** Cromatogramas das amostras de óleos essenciais A, B, C e D.







Carvalho Jr. et al (2004) encontrou os mesmos constituintes majoritários estudando o óleo essencial da mesma espécie cultivada no estado de São Paulo. Nizio e colaboradores (2015) por sua vez encontraram triciclono,  $\alpha$ -zingibereno, turmerona, canfeno e (E)-cariofileno como os constituintes principais em óleos de erva-baleeira cultivadas em Sergipe. Os constituintes  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -santaleno e (E)-cariofileno foram os principais compostos encontrados por Sciarrone et al (2017).

No presente estudo, a composição dos óleos essenciais extraídos por arraste a vapor em escala industrial apresentou variação. Ao estabelecer comparativo entre as amostras analisadas, observa-se que apenas na amostra A há a presença do composto  $\beta$ -santaleno, apenas na amostra B o constituinte  $\beta$ -funebreno é encontrado e somente na amostra C os compostos D-limoneno e bergamotol.

As substâncias mirceno e bornil-acetato são encontradas nas amostras A e B, enquanto  $\alpha$ -tujeno é visto nos óleos C e D. Os compostos copaeno e  $\alpha$ -santalona não

apareceram nas amostras C. Por fim,  $\beta$ -bisaboleno não foi encontrado na amostra A,  $\beta$ -sesquifelandreno na amostra B e amorpho-4,7(11)-diene na amostra D.

**Tabela 1.** Compostos identificados em óleos essenciais extraídos da espécie *Varronia curassavica* Jacq em diferentes idades por destilação por arraste à vapor em escala industrial. Tempo de retenção (TR), Índice de Kovats da literatura (IK.<sub>lit</sub>), Índice de Kovats calculado (IK.<sub>cal</sub>), Amostra (%): Percentual de área de cada substância relativa ao cromatograma total.

CONSTITUINTES	TR (min)	IK. <sub>lit</sub>	IK. <sub>cal</sub>	AMOSTRA A (%)	AMOSTRA B (%)	AMOSTRA C (%)	AMOSTRA D (%)
$\alpha$ -tujeno	10,74	930	941,98	-	-	1,35	1,56
Sabineno	10,78	975	943,24	1,20	1,49	1,05	0,95
<b><math>\alpha</math>-pineno</b>	<b>11,17</b>	<b>961</b>	<b>955,50</b>	<b>33,08</b>	<b>34,60</b>	<b>33,45</b>	<b>37,55</b>
Myrceno	12,08	990	984,12	1,1	1,22	-	-
$\beta$ -pineno	12,33	979	991,98	1,34	1,30	1,13	1,42
D-limoneno	13,60	1040	1031,93	-	-	0,45	-
1,8-Cineol	13,72	1031	1035,70	1,79	1,74	1,56	1,65
Bornil acetato	21,25	1288	1272,52	0,78	0,56	-	-
$\delta$ -elemeno	23,25	1338	1335,42	3,35	4,13	3,66	4,03
Copaeno	24,55	1376	1376,30	0,73	0,56	-	0,58
$\beta$ - elemeno	24,84	1390	1385,42	4,15	5,66	5,26	4,62
Trans- $\alpha$ -bergamoteno	25,24	1434	1398,00	1,09	1,10	1,03	0,96
$\alpha$ - santaleno	25,65	1417	1410,90	8,29	8,67	7,74	7,34
<b>Trans-cariofileno</b>	<b>25,95</b>	<b>1419</b>	<b>1420,33</b>	<b>13,05</b>	<b>16,25</b>	<b>18,25</b>	<b>12,52</b>
$\beta$ - cedreno	26,10	1420	1425,05	1,74	-	1,54	1,42
$\beta$ -funebreno	26,22	1429	1428,82	-	1,75	-	-
$\beta$ -santaleno	26,58	1447	1440,15	0,77	-	-	-
<b><math>\alpha</math>- humuleno</b>	<b>26,98</b>	<b>1454</b>	<b>1452,73</b>	<b>2,69</b>	<b>3,32</b>	<b>4,17</b>	<b>2,62</b>
Alloaromadendreno	27,13	1452	1457,44	9,51	6,85	7,04	7,37
9-Epi-E-cariofileno	27,28	1466	1462,16	2,91	2,14	2,27	2,16
$\beta$ - bisaboleno	27,59	1528	1471,91	-	0,59	0,56	0,53
$\beta$ -sesquifilandreno	28,05	1522	1486,38	0,81	-	0,69	0,66
$\delta$ -cadineno	28,24	1523	1492,35	-	-	-	1,99
Amorpha-4,7(11)-diene	28,33	1481	1495,18	2,38	1,98	1,99	-
Bergamotol	32,59	1690	1629,16	-	-	0,86	-
$\alpha$ -santalona	32,78	1577	1635,14	0,96	0,96	-	1,23
Santalol (Z)- $\alpha$	33,17	1675	1647,40	1,20	1,24	1,06	1,46
TOTAL				93	96,37	95,19	92,75
DESCONHECIDOS				7	3,63	4,81	7,25

A influência da idade da planta no momento da colheita sobre a produção de óleo essencial vem sendo estudada em diferentes espécies aromáticas, como *Lippia sidoides*, *Porophyllum ruderale*, *Lippia alba*, *Cymbopogon citratus* e *Mentha arvensis*

(SANTOS; INNECCO, 2004; FONSECA et al., 2007), apresentando respostas diferenciadas para cada espécie.

Alterações na composição química do óleo essencial, em relação à idade da planta foram encontradas para outras espécies como *Pycnocycla spinosa* (ASGHARI et al., 2002), *Alpinia zerumbet* e *Myrcia salzmanni* (CERQUEIRA et al., 2009), demonstrando que alguns compostos podem ser mais sensíveis que outros em relação à idade, ao estágio de desenvolvimento da planta e outros fatores como a sazonalidade (MURAKAMI et al., 2009). Oliveira et al., (2011) ao estudarem a produção do óleo essencial de *Mentha x piperita* var. *citrata*, concluíram que a idade da planta influencia tanto o rendimento quanto a composição química dessa espécie.

Pinto (2017) estudando a influência da idade da planta na constituição química do óleo essencial de uma espécie de *Lippia*, estabeleceu uma análise comparativa entre as idades de 1 e 10 anos e verificou alteração na produção de linalool, geraniol. Os compostos secundários presentes no óleo essencial também sofreram variação, uma vez que houve variabilidade dos constituintes nas amostras analisadas.

### 3.3 Análise quantitativa dos óleos essenciais

#### 3.3.1 Rendimento

A quantidade de óleo essencial obtido do processo extrativo de *Varronia curassavica*, bem como valores de rendimento são demonstrados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Rendimento dos óleos essenciais extraídos em escala industrial por destilação por arraste a vapor.

Amostra	Extração	MPV*(Kg)	Óleo (Kg)	Rendimento (%)
A	SET/2016	1252	1.160	0.093%
B	MAR/2017	1300	1.250	0.096%

C	JUL/2017	1200	0.996	0,083%
D	NOV/2017	889,43	1.000	0.112%

\*MPV = Matéria Prima Vegetal.

Os resultados obtidos demonstraram um rendimento de 0.093% para a amostra A, 0.096% para a amostra B, 0,083% para a amostra C e 0,112% para a amostra D. Os trabalhos encontrados na literatura utilizando a mesma espécie vegetal, em sua grande maioria, descrevem o valor de rendimento do óleo essencial obtido em escala laboratorial utilizando o método de hidrodestilação por aparelho do tipo Clevenger modificado.

Tanto o potencial de atividade farmacológica quanto a vulnerabilidade das substâncias químicas que compõem óleos essenciais de plantas medicinais tem despertado interesse de diversos grupos de pesquisa preocupados com a obtenção de um produto de qualidade (BORSATO et al., 2008).

A técnica de destilação por arraste a vapor para a extração de óleos essenciais é bastante difundida mundialmente. Por não necessitar de grandes conhecimentos técnicos para ser operada, há a facilidade de sua implementação em escala industrial, possibilitando assim extração de maiores quantidades de óleo e um baixo custo operacional (SARTOR, 2009). Romdhane e Tizaoui (2005), confirmam que além de produzir um óleo de alta qualidade, esse processo de extração não agride o meio ambiente.

Carvalho Júnior et al. (2004) verificaram um rendimento de óleo essencial de 0,23%, extraído de folhas frescas de *V. curassavica*. Outro grupo de pesquisa, estudando da atividade biológica do óleo essencial também de folhas erva-baleeira, obteve um rendimento médio de 0,38% pelo mesmo método extrativo (GUZZO et al., 2009). Passos et al. (2007), realizaram hidrodestilação e obtiveram rendimento de 0,37% de óleo.

Marques (2016), avaliando a interferência da sazonalidade no rendimento do óleo essencial da erva-baleeira coletada em 05 acessos, também pelo método de hidrodestilação, observou rendimentos que variavam de 1,18 a 0,23% a depender da estação do ano que planta foi coletada. Queiroz et al. (2016), estudando o teor do óleo da mesma espécie em função do horário de coleta encontrou valores de 1,36 a

1,04% dependendo do horário em que foi coletada. Pinto (2017) averiguando a influência da idade da planta na composição química e atividade formicida do óleo essencial de *Lippia alba*, encontrou variação significativa na concentração de óleo essencial extraído de plantas de 1 ano de idade e 10 anos de idade.

Os valores de rendimento obtidos pelo método de hidrodestilação encontrados na literatura foram bastante superiores ao rendimento do óleo obtido da mesma espécie extraído por destilação à vapor em escala industrial. Bezerra et al. (2010) avaliando o rendimento do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* obteve melhores rendimentos de óleo essencial quando a biomassa foi submetida ao processo de hidrodestilação do que ao de arraste à vapor. O mesmo resultado foi encontrado por Borsato et al. (2008) estudando o óleo essencial da camomila. O rendimento do óleo essencial da camomila obtido por arraste a vapor foi de apenas 0,2%, bem menor que o obtido por meio da hidrodestilação (0,91%) em aparelho do tipo Clevenger.

Devido à diferença de equipamento e operação na extração por arraste a vapor em laboratório e na indústria, a curva de extração não é a mesma. No laboratório, o material vegetal é geralmente pré-tratado antes do processo, ocasionando o aumento da sua eficiência. Nesse caso, uma maneira de se representar melhor uma unidade industrial é a criação de uma unidade piloto, a qual aproxima os dados laboratoriais ao que ocorre efetivamente na indústria de óleos essenciais (SARTOR, 2009).

### 3.3.2 Quantificação das substâncias de interesse

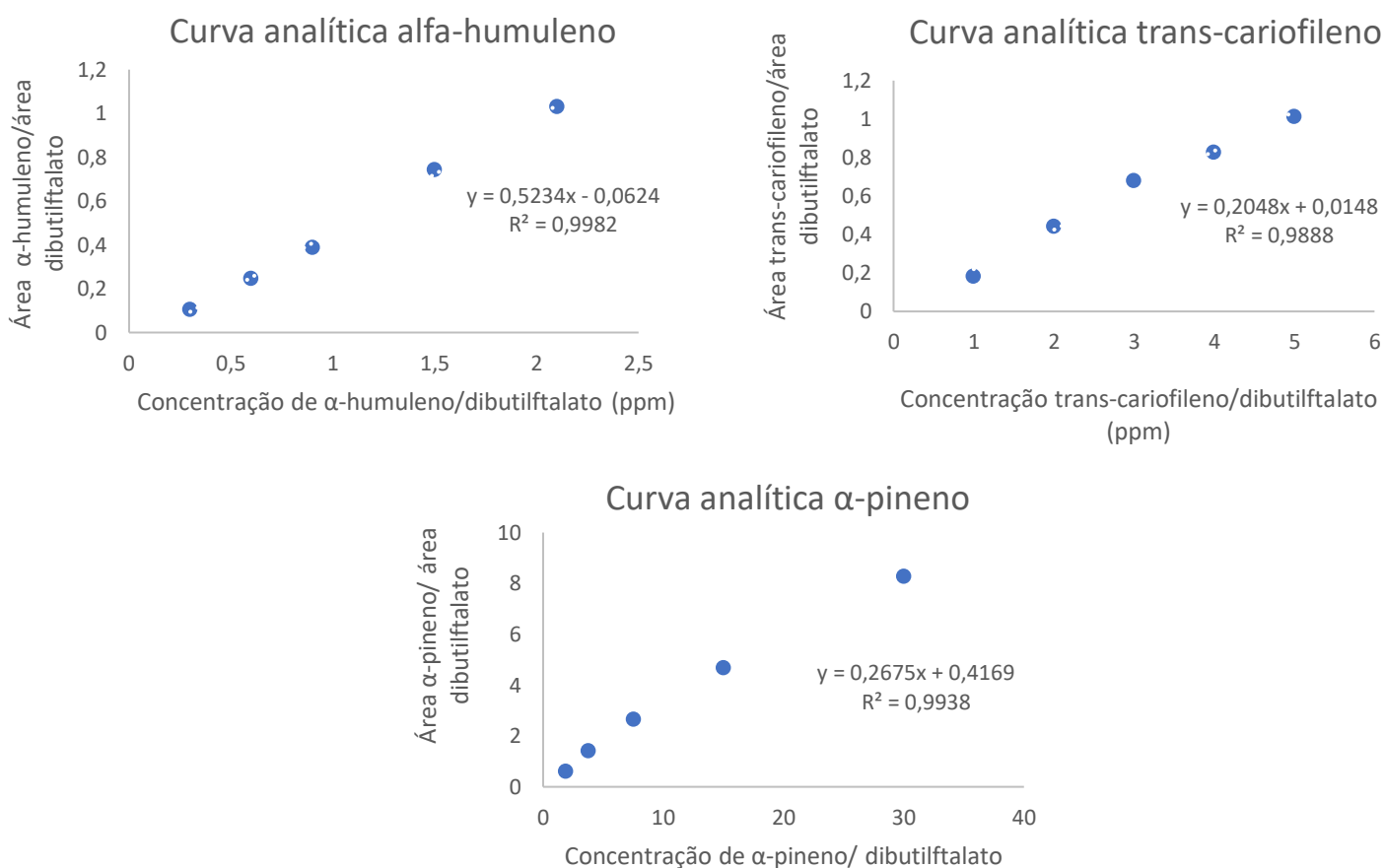
A quantificação absoluta das substâncias foi realizada utilizando o método de padrão interno através da análise GC-MS do óleo essencial (n = 4 para cada amostra).

Os padrões analíticos de trans-cariofileno (98% pureza),  $\alpha$ -humuleno (99% pureza),  $\alpha$ -pineno (99% pureza) e o padrão interno dibutilftalato (99% pureza) empregados neste estudo foram obtidos da Sigma-Aldrich. As soluções estoque foram preparadas em acetona nas seguintes concentrações:  $\alpha$ -humuleno (600 ppm); transcariofileno (1000 ppm) e  $\alpha$ -pineno (6000 ppm). Foram construídos 5 pontos de concentração em balões volumétricos de 10 mL para as curvas analíticas, onde em cada ponto foi adicionado 1 mL da solução de padrão interno dibutilftalato correspondendo a uma concentração fixa de 200 ppm.

As curvas analíticas dos padrões de  $\alpha$ -humuleno, trans-cariofileno e  $\alpha$ -pineno foram obtidas através dos valores de concentração utilizados para a construção da

curva versus os valores das suas áreas sob a área do padrão interno. Para cada amostra de óleo essencial analisada foi realizada uma curva de calibração de cada substância a ser quantificada. As curvas analíticas do alfa-humuleno, trans-cariofileno e alfa-pineno são apresentadas na figura 4, enquanto seus respectivos dados são demonstrados nas tabelas 3 a 5.

**Figura 4.** Curvas analíticas dos compostos alfa-humuleno, trans-cariofileno e alfa-pineno,



**Tabela 3.** Dados para a construção da curva analítica do padrão de alfa-humuleno.

CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	ÁREA DOS PICOS (MÉDIA)
0,3	26,98	0,105±0,009***
0,6	26,98	0,248±0,004***
0,9	26,98	0,388±0,012***
1,5	26,98	0,744±0,059***

2,1	26,98	1,030±0,032***
-----	-------	----------------

Valores são apresentados como média +/- Erro padrão. N=3.

**Tabela 4.** Dados para a construção da curva analítica do padrão de trans-cariofileno.

CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	ÁREA DOS PICOS (MÉDIA)
1	25,95	0,184±0,002***
2	25,95	0,441±0,004***
3	25,95	0,679±0,003***
4	25,95	0,828±0,017***
5	25,95	1,030±0,0005***

Valores são apresentados como média +/- Erro padrão. N=3.

**Tabela 5.** Dados para a construção da curva analítica do padrão de  $\alpha$ - pineno.

CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	ÁREA DOS PICOS (MÉDIA)
1,87	11,17	0,607±0,040***
3,75	11,17	1,415±0,066***
7,5	11,17	2,656±0,093***
15	11,17	4,671±0,132***
30	11,17	8,284±0,185***

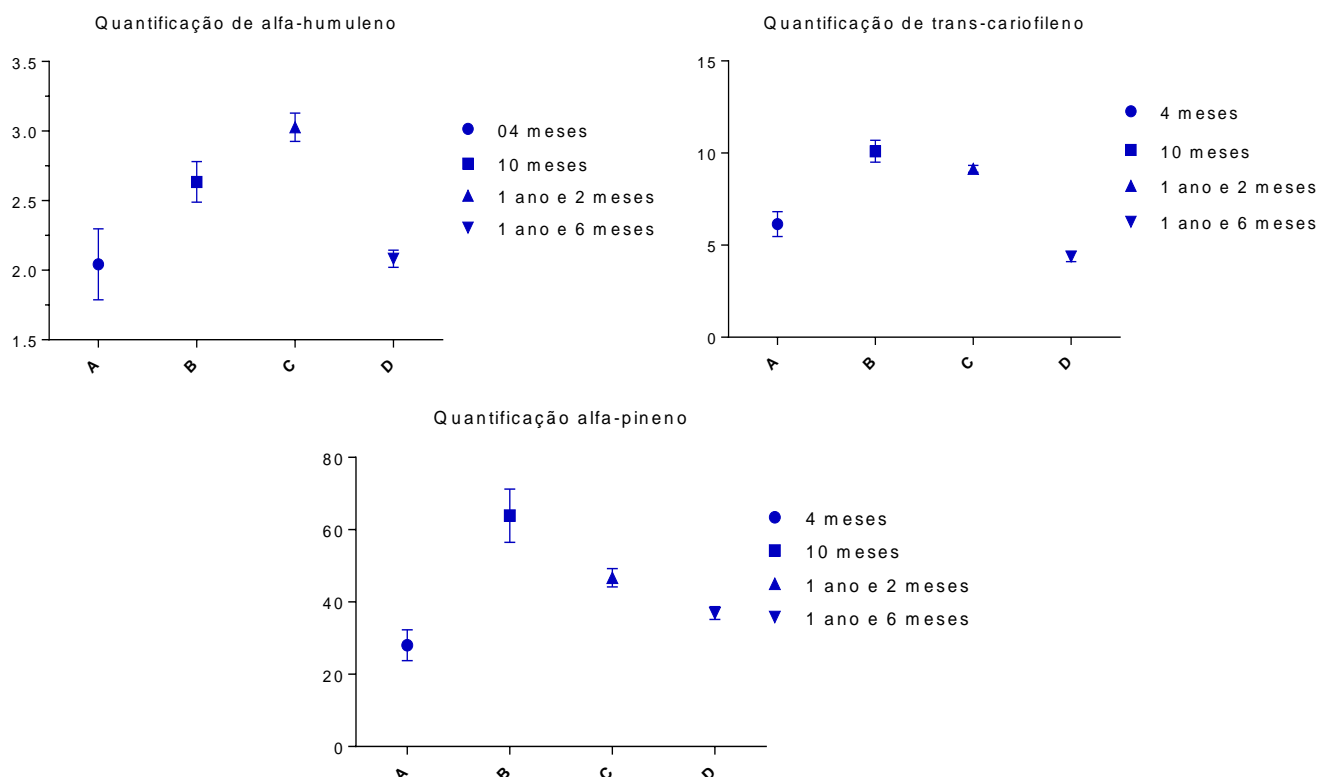
Valores são apresentados como média +/- Erro padrão. N=3.

Após a realização dos cálculos envolvendo dos dados obtidos através da curva de calibração, bem como de peso da amostra, diluição utilizada para o preparo das soluções e pureza do padrão, os resultados da quantificação de alfa-pineno, alfa-humuleno e trans-cariofileno para cada amostra de óleo essencial foram obtidos como observado na Figura 5 e Tabela 6.

De acordo com os resultados obtidos, o teor de alfa-humuleno presente nas amostras A,B,C, e D de óleo essencial de *V.curassavica* extraído por arraste a vapor em escala industrial apresentou diferença significativa entre as diferentes idades com  $p < 0,0001$ . Através da realização de múltiplas comparações dos dados para essa

substância foi possível verificar que as amostras A e D não apresentaram diferença significativa para os compostos alfa-humuleno e alfa-pineno.

**Figura 5.** Quantificação das substâncias nas amostras de óleo essencial de *V.curassavica*



**Tabela 6.** Determinação dos teores (%) dos compostos alfa-pineno, trans-cariofileno e alfa-humuleno nos óleos essenciais A, B, C e D extraídos de *V.curassavica* em diferentes idades.

AMOSTRAS	IDADE	COMPOSTOS (%)		
		ALFA-HUMULENO	TRANS-CARIOFILENO	ALFA-PINENO
A	4 meses	2,04±0,256****	6,14±0,679****	28,03±4,25****
B	10 meses	2,635±0,145****	10,10±0,594****	63,87±7,36****
C	1 ano e 2 meses	3,02±0,102****	9,14±0,189****	46,70±2,519****
D	1 ano e 6 meses	2,08±0,062****	4,38±0,270****	36,92±1,760****

Valores são apresentados como média +/- Erro padrão. N=4.



Também foi encontrado através das análises quantitativas desse estudo diferença significativa entre os teores de trans-cariofileno encontrados nas quatro amostras de diferentes idades, com  $p < 0,0001$ . Os teores dessa substância nas amostras B e C não apresentaram diferença significativa entre eles.

A composição química dos óleos essenciais é determinada por diversos fatores que podem acarretar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários, como por exemplo, a idade da planta. Letchamo e Marquard (1993), ao estudarem a camomila cultivada no Canadá observaram oscilação na constituição química da planta nas diferentes idades e uma diminuição na porcentagem do  $\alpha$ -bisabolol a cada avançar da idade.

Estudos sobre a influência da idade da planta na constituição do óleo essencial de variedades de *Ocimum basilicum* averiguaram que as substâncias metilchaviol e linalool exibiram padrões variáveis de acordo com a data de colheita das plantas, sendo que esta última exibiu uma tendência decrescente com o aumento da idade das espécies em estudo (KAKARAPARTH et al., 2015). Para as espécies *Alpinia zerumbet* (Murakami et al., 2009) e *Hyptis suaveolens* (Martins et al., 2006) a idade da planta também influenciou a constituição dos seus respectivos óleos essenciais.

Oliveira et al, 2012 ao averiguar essa mesma variável na constituição do óleo essencial de alevante concluiu que o alfa-fenchol e cis-mirtanol, compostos majoritários identificados no óleo, apresentaram teores variáveis de acordo com a idade da planta. Ozkan e colaboradores 2010 ao investigar o óleo essencial de orégano (*Origanum onites* L.) observaram que ao longo dos meses o carvacrol, um dos componentes principais apresentados, teve o seu conteúdo total alterado. Por fim, Pinto (2017) trabalhando com *Lippia alba* diz que seu estudo comprovou que a idade da planta influencia na produção e a constituição química do óleo essencial.

De acordo com a literatura, de maneira geral, há uma correlação inversa entre alta atividade metabólica e produção de aleloquímicos, o que gera uma diminuição na produção de metabólitos secundários em rápidos períodos de crescimento da planta (GOBBO-NETO; LOPES, 2007), assim como é observado o mesmo comportamento quando a planta começa a entrar em senescência. Moraes (2009), aborda que a idade da planta pode redirecionar a via metabólica da planta e levar à biossíntese de

diferentes substâncias que podem causar um aumento de determinados compostos. As amostras que apresentaram teor de alfa-humuleno mais interessante para a indústria foram as amostras B e C, de idade intermediária correspondente à 1 ano e 2 meses e 1 ano e 6 meses respectivamente.

### **3.4 Análise de componentes principais (ACP) e hierárquicos (ACH)**

As ferramentas quimiométricas permitem o agrupamento e separação de dados multivariados. Possuem como finalidade, o entendimento mais completo e sistematizado dos resultados derivados da utilização de técnicas analíticas cromatográficas (PEREIRA, 2017). As duas técnicas de análise mais conhecidas são a Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA).

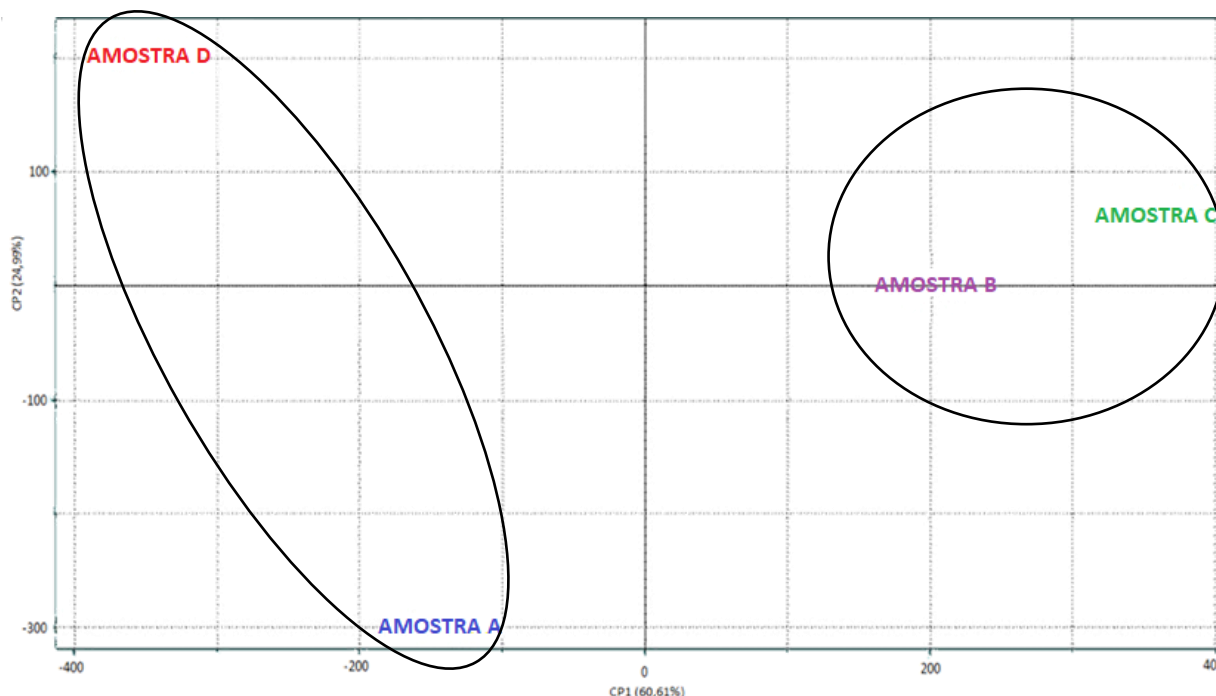
A primeira, trata-se de um método exploratório que auxilia na elaboração de hipóteses através dos dados coletados, permitindo estimar a influência das variáveis nas amostras no espectro de diferenciação, e não de quantificação. Constitui-se como um procedimento matemático que utiliza a ortogonalização de vetores para converter um conjunto de observações de variáveis possivelmente correlacionadas num conjunto de valores de variáveis linearmente não correlacionadas chamadas de componentes principais. A primeira componente principal tem a maior variância possível (sendo responsável pelo máximo de variabilidade nos dados), e cada componente seguinte, por sua vez, tem o restante da variância sob os dados.

A segunda análise exhibe os dados de maneira a enfatizar os seus agrupamentos e padrões naturais, determinando semelhanças entre as amostras (PANERO, et al., 2009). A análise de componentes principais foi aplicada aos dados obtidos por GC-MS.

Através dos resultados obtidos para a análise dos constituintes dos óleos essenciais, constatou-se que as duas primeiras componentes principais foram suficientes para descrever os dados, uma vez que elas possuem variância total acumulada de 85,60%. A primeira componente principal (CP1) descreve 60,61% da

variação total, enquanto a segunda componente principal (CP2), 24,99%. A figura 6 apresenta o gráfico de *scores* das amostras de CP1 versus CP2.

**Figura 6.** Gráfico dos *scores*, CP2 vs CP1, var. tot. 85,60%, amostras A, B,C e D.



Por intermédio da componente principal 1, que possui maior probabilidade de análise de componentes, é possível observar a formação de dois grupos. Há uma provável correlação entre as amostras de mesmos sinais e na mesma proporção, uma inversabilidade entre as amostras de sinais diferentes (positivo e negativo). Dessa maneira, há a formação de um grupo representado pelas amostras B e C e outro representado pelas amostras A e D.

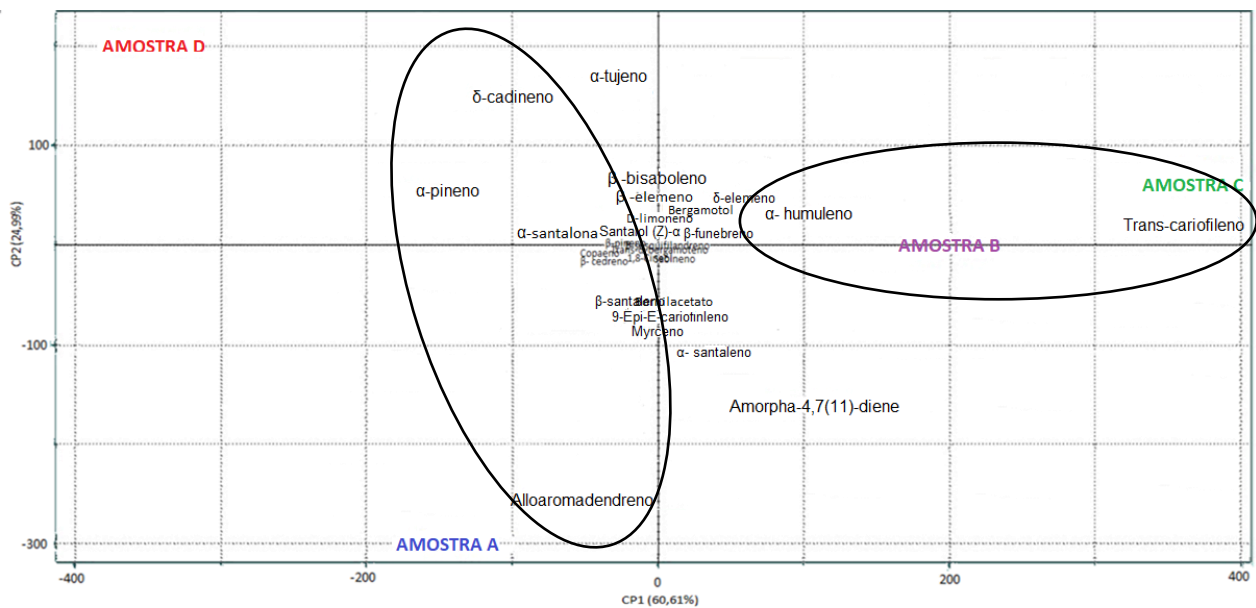
O gráfico de *loadings* na figura 7 mostra a influência das variáveis sobre as amostras. Fazendo uma análise a partir da CP1 é possível identificar que as substâncias que mais contribuem para o agrupamento das amostras A e D são alfa-pineno (-0,0536),  $\delta$ -cadineno (-0,2378),  $\alpha$ -santalona (-0,1566) e alloaromadendreno (-0,1831), enquanto que as para as amostras B e C são alfa-humuleno (0,1870) e transcariofileno (0,7973).

Sob a ótica da segunda componente principal os valores mais positivos, representados pelas substâncias  $\delta$ -cadineno (0,3510),  $\alpha$ -tujeno (0,3698) e  $\alpha$ -pineno (0,1355) diferenciam a amostra D da amostra A, sendo esta última, representada

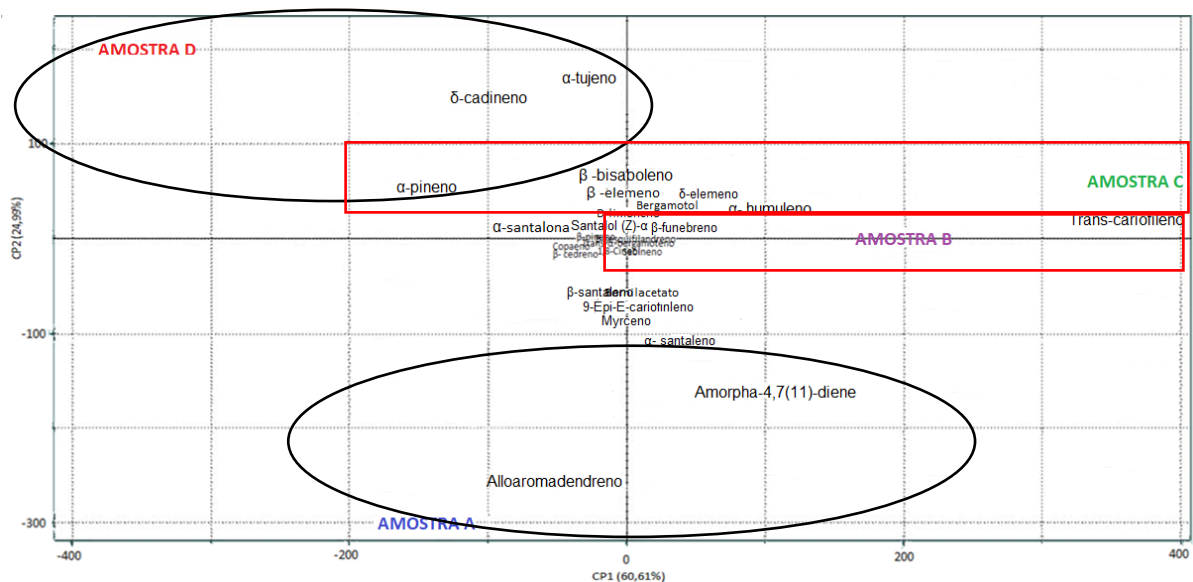
pelos valores mais negativos encontrados em alloaromadendreno (-0,5818) e amorfa-4,7(11)-diene (-0,3572). Observa-se ainda uma maior semelhança entre as amostras B e C, que são diferenciadas por valores muito aproximados, sendo alfa-pineno (0,1355), beta-elemeno (0,1179),  $\delta$ -elemeno (0,1870) e beta-bisaboleno (0,1790) mais representativas para C e beta-funebreno (0,06020) para B.

**Figura 7.** Gráfico dos loadings, CP2 vs CP1. Influência das variáveis no agrupamento das amostras A e D e B e C de acordo com a CP1 (I). Influência das variáveis na discriminação das amostras A, B, C e D de acordo com a CP2 (II).

(I)



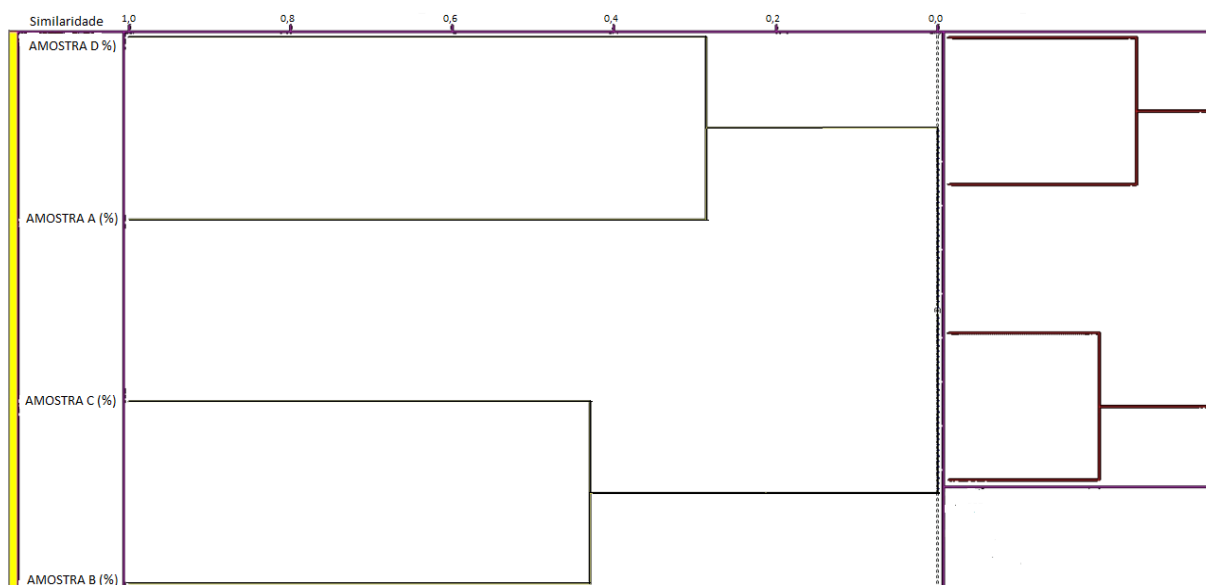
(II)



As tendências observadas através da análise de componentes principais (PCA) foram confirmadas através do dendrograma obtido pela HCA. O dendrograma apresentado na figura 8 possui eixo vertical apresentando as variáveis e eixo horizontal com as medidas de similaridade calculadas através da distância euclidiana. Inicialmente, pode-se observar a formação de dois grupamentos separados, com distância euclidiana normalizada de 7,53%.

Os resultados obtidos através das associações entre as amostras do estudo demonstram uma tendência de agrupamento entre as amostras A e D com nível de similaridade de 28,6% e entre as amostras B e C com nível na altura de 43%, apresentando forte similaridade entre si.

**Figura 8.** Dendrograma representando análise de Grupamentos hierárquicos das amostras de óleo essencial A, B, C e D.



### 3.5 Atividades biológicas dos óleos essenciais

#### 3.5.1 Atividade antimicrobiana

Os óleos essenciais representam uma importante fonte de compostos que atuam no combate a agentes infecciosos, tendo algumas espécies, sua eficácia comprovada cientificamente. A variação da atividade biológica exercida é dependente da sua composição. Os constituintes químicos desses óleos são responsáveis por

propriedades antissépticas, antibacterianas, antifúngicas e antiparasitárias (SARTO; ZANUSSO JUNIOR, 2014). Os resultados antimicrobianos encontrados neste estudo são representados na tabela 7.

**Tabela 7.** Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) para os óleos essenciais A, B, C e D extraídos de *V. curassavica* de diferentes idades.

<b>BACTÉRIAS</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>S. MRSA</i> ATCC 43300	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>1000	>1000	>1000	>1000
<b>FUNGO</b>				
<i>C. albicans</i>	1000	1000	1000	1000

Uma análise cuidadosa dos resultados de CIM obtidos para os óleos essenciais deste trabalho foram próximos aos encontrados por Hernandez et al., (2014). Ao estudarem a variação da composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *V. curassavica* em duas estações do ano, os autores encontraram uma CIM para *S. epidermidis* de 750 a 1000  $\mu\text{g/mL}$  e para *S. aureus* de 1000 a 1500  $\mu\text{g/mL}$ .

Meccia e colaboradores (2009) por sua vez, encontraram resultados discrepantes trabalhando com a mesma espécie cultivada na Venezuela, com CIM de 170  $\mu\text{g/mL}$  para *S. aureus*. Rodrigues et al. (2012), avaliando a atividade antimicrobiana da erva-baleeira contra cepas bacterianas encontrou uma CIM >1024 para *P. aeruginosa*, similar ao encontrado neste trabalho. Além disso, concluiu que há indícios de que a atividade antimicrobiana do óleo seja mais eficiente para bactérias Gram-positivas do que para as Gram-negativas.

Cruz et. al, (2017) ao investigar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *V. curassavica* frente a cepas de bactérias de interesse clínico, encontrou uma CIM de 100  $\mu\text{L/mL}$  para as cepas de *S. aureus* e *E.coli*, enquanto Pinho (2012), não encontrou efeito inibitório para esta última e uma CIM de 400  $\mu\text{L/mL}$  para *S.aureus*.

O óleo essencial dessa espécie possui atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos como *Pseudocercospora griseola*, *Colletotrichum truncatum*, e

*Ichthyophthirius multifiliis* (SILVA et. al, 2012; HOYOS et.al, 2012; SILVA et.al, 2014; NIZIO, 2015) e fungos oportunistas causadores de doenças no homem como os do gênero *Candida* sp. No presente estudo foi encontrado uma CIM de 1000 µg/mL para todas as amostras de óleo essencial testadas contra a espécie de *Candida albicans*.

De Carvalho e colaboradores (2004) utilizando o teste de difusão em ágar para conhecer o potencial antimicrobiano do óleo de erva-baleeira, encontraram halos de inibição que variaram de 15 a 48 mm contra mais de 10 espécies de *Candida*, concluindo que o óleo possui potencial antifúngico contra estes micro-organismos. Braga et. al, (2006) ao avaliar a atividade antifúngica e anti-leishmania de plantas medicinais utilizadas no Brasil não encontrou efeito do óleo essencial contra cepas de *Candida albicans*.

Algumas características intrínsecas aos óleos essenciais podem afetar de forma significativa a resposta de suas atividades biológicas quando testadas em metodologias in vitro, como por exemplo, sua volatilidade e natureza hidrófila. Em decorrência disso, é comum encontrar na literatura variações tanto com relação aos testes utilizados, quanto as respostas encontradas (Hammer et al., 1999).

Além disso, diversos fatores agrupados em genéticos, ambientais, técnicas de extração podem afetar a composição química dos óleos e provocar, dessa maneira alguma alteração na resposta à atividade antimicrobiana (Lambert et al., 2001).

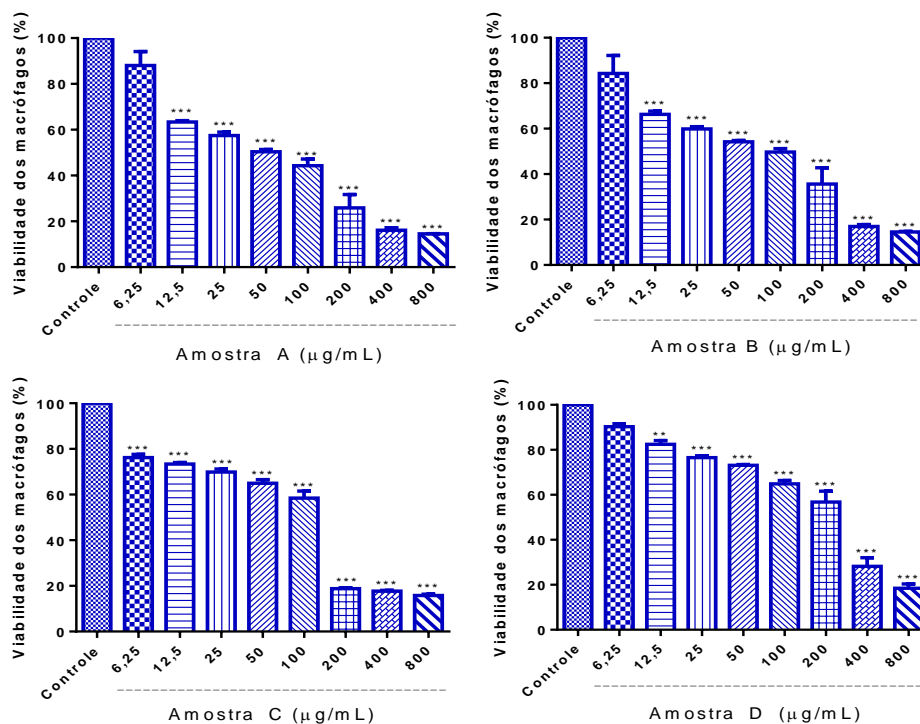
Neste estudo, não foi verificada diferença na resposta da atividade antibacteriana e antifúngica das amostras de óleo essencial advindas da extração de *V. curassavica* em diferentes idades.

### 3.5.2 Atividade citotóxica

O ensaio de MTT é um dos indicadores colorimétricos de viabilidade celular mais utilizados, uma vez que possui a capacidade de avaliar a função celular mitocondrial de acordo com a redução enzimática do sal de tetrazólio pelas desidrogenases mitocondriais em células viáveis (Mosmann, 1983). A avaliação da citotoxicidade das amostras de óleo essencial sobre macrófagos é apresentada na figura 9, enquanto os valores de CC<sub>50</sub> são descritos na tabela 8.

**Figura 9.** Efeito citotóxico das amostras A, B, C e D contra macrófagos peritoneais de murinos BALB/c. Os dados são apresentados como média ± SEM de três

experimentos realizados em triplicata \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* quando comparado com o controle.



**Tabela 8.** Efeitos citotóxicos (CC50) contra células de mamíferos para as amostras de óleo essencial.

AMOSTRAS	MACRÓFAGOS CC50 (µg/mL)
A	47,99
B	60,22
C	73,18
D	171,90

Os resultados obtidos evidenciaram que a amostra A demonstrou toxicidade significativa a partir de 12,5 µg/mL, com maior valor de citotoxicidade contra macrófagos dentre todas as amostras, com CC<sub>50</sub> igual a 47,99 µg/mL. As amostras B e D por sua vez, apesar de reduzirem a viabilidade celular na mesma concentração da amostra A, apresentaram uma CC<sub>50</sub> de 60,22 µg/mL e 171,90 µg/mL respectivamente. A amostra C, em todas as concentrações utilizadas no ensaio,



apresentou toxicidade significativa, resultando numa CC<sub>50</sub> equivalente a 73,18 µg/mL.

Braga e colaboradores (2006) investigando as atividades de plantas medicinais utilizadas na medicina tradicional brasileira encontraram, utilizando o mesmo ensaio de citotoxicidade utilizando macrófagos J774 uma IC<sub>50</sub> igual a 120 µg/mL para a erva-baleeira. Andrade et al. 2016, investigando as atividades biológicas de diversos óleos essenciais encontrou através da avaliação da toxicidade *in vitro* em células musculares L6 uma IC<sub>50</sub> igual a 130 µg/mL para a mesma espécie. Resultados semelhantes foram encontrados por Parisotto (2011) avaliando o potencial citotóxico do extrato bruto e supercrítico de *V. curassavica* frente a células do carcinoma de Erlich com IC<sub>50</sub> igual a 133,96 e IC<sub>50</sub> igual a 198,40, respectivamente.

Um dos critérios mais aceitos na avaliação de citotoxicidade de uma substância, é que para ser considerada tóxica deve apresentar a capacidade de induzir citotoxicidade com IC<sub>50</sub> menor que 200 µg/mL (SUFFINES; PEZZUTO, 1990). Todas as amostras testadas apresentaram valores inferiores ao referenciado, sendo o óleo essencial da amostra D o menos ativo.

As análises de componentes principais PCA e componentes hierárquicos HCA diferenciaram as amostras de acordo com a influência dos seus constituintes. Os resultados encontrados revelaram que umas das substâncias de maior valor para a amostra D é o alfa-pineno. Estudos de avaliação citotóxica do óleo essencial de folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Identificaram uma CC<sub>50</sub> do alfa-pineno para linhagens de células Vero acima de 200 µg/mL (SILVA; FIGUEIREDO; YANO, 2007). Dessa maneira, uma menor concentração citotóxica observada pela amostra D pode ser decorrente da influência exercida por esse composto.

Dentre os compostos que possuem maior valor na diferenciação das amostras B e C de A e D encontram-se as substâncias alfa-humuleno e transcariofileno. Tai substâncias possuem suas toxicidades bem descritas na literatura tanto para linhagens e células normais, quanto para linhagens de células tumorais, incluindo He-la, A-549 e CT-26 (LEGAULT et al., 2003; SYLVESTRE et al., 2006; HOU et al., 2006). O alfa-humuleno apresentou uma CC<sub>50</sub> igual a 109.7 e 179.3 µg/mL para linhagem de células Vero, enquanto o trans-cariofileno demonstrou valores de CC<sub>50</sub> igual a 80.3 µg/mL em estudos realizados com óleos essenciais (SILVA;

FIGUEIREDO; YANO, 2007). Da mesma maneira, o valor de  $CC_{50}$  apresentado pelas amostras B e C pode ser resultante da maior proximidade a esses sesquiterpenos.

A amostra A foi o óleo essencial que apresentou menor valor de  $CC_{50}$ , e por isso, maior toxicidade. Dois compostos foram identificados como contribuintes para a sua diferenciação: o alloaromadendreno e o amorfa 4,7(11)-diene.

#### 4. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que a composição química do óleo essencial de *Varronia curassavica* Jacq. sofreu variação significativa com a influência da idade da planta. Os principais constituintes dos óleos essenciais do estudo são o  $\alpha$ -pineno, trans-cariofileno e alloaromadendreno. As amostras que obtiveram níveis aceitáveis de citotoxicidade e apresentaram teor de alfa-humuleno mais interessante para a indústria foram as amostras B e C, de idade intermediária correspondente à 1 ano e 2 meses e 1 ano e 6 meses respectivamente.

A avaliação da ação antibacteriana das amostras de óleo essencial frente às estirpes utilizadas no estudo permitiu concluir que a concentração inibitória mínima encontra-se acima de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto a atividade antifúngica observada para a espécie *Candida albicans* demonstrou uma CIM de 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Ambas não sofreram influência da mudança da composição química dos óleos essenciais extraídos da planta em diferentes idades.

A atividade citotóxica, por sua vez, foi maior para a amostra A ( $\text{CC}_{50}$  49,18  $\mu\text{g/mL}$ ), seguida das amostras B ( $\text{CC}_{50}$  59,02  $\mu\text{g/mL}$ ), C ( $\text{CC}_{50}$  66,67  $\mu\text{g/mL}$ ) e D ( $\text{CC}_{50}$  159,81  $\mu\text{g/mL}$ ). A análise estatística multivariada de PCA e HCA permitiu a diferenciação das amostras de acordo com suas respectivas substâncias de maior importância. A diferença na resposta citotóxica pode ter sido influenciada pela diferença de composição. Essa diferença de atividades deve ser amplamente investigada.

## 5. PERSPECTIVAS

- Utilizar os padrões quantificados nas amostras para a realização do ensaio MTT;
- Investigar a diferença na composição do óleo essencial da espécie extraído da planta em idades mais avançadas;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória das amostras de óleo essencial extraídos em diferentes idades da planta;
- Investigar a ação antibacteriana e antifúngica utilizando outras espécies de interesse clínico;
- Investigar a citotoxicidade do alloaromadendreno e amorfa 4,7(11)-dieno.

## 6. REFERENCIAS

ADAMS, R.P. **Identification of essential oils components by gas chromatography mass spectroscopy**.4. ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007.804p.

ALVES, M.M.M.; BRITO, L.M.; SOUZA, A.C.; QUEIROZ, B.C.S.H.; CARVALHO, T.P.; BATISTA, J.F OLIVEIRA, J.S.S.M.; MENDONÇA, I.L LIRA, S.R.S.; CHAVES, M.H.; GONÇALVES, J.C.R.; CARNEIRO, S.M.P.; ARCANJO, D.D.R.; CARVALHO, F.A. Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by *Leishmania major*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology** v.390, p.893–90, 2017.

ASGHARI, G.; HOUSHFAR, G.; MAHMOUDI, Z. Seasonal variation of mono and sesquiterpenes in the essential oil of *Pycnocycla spinosa* Decne. Exboiss. **Iranian Journal Pharmaceutical Research**,v.1, p.61-63, 2002.

BARROS, F. B. Sociabilidade, cultura e biodiversidade na beira de Abaetetuba no Pará. **Ciências Sociais Unisinos**, v. 45, n. 2, p.152-161, 2009.

BEZERRA, A. N. S. et al. Avaliação do rendimento do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (g. meyer) em função do método de extração e do processamento da biomassa. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o progresso da ciência. Natal. Resumos**. Natal: UFRN, p. 3227, 2010.

BOLZANI, V.S; VALLI, M.; PIVATTO, M.; VIEGAS JR, C. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal Chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 1837–1846, 2012.

BORSATO, A.V; DONI-FILHO, L.; CÔCCO L.C.; PAGLIA, E.C; Yield and chemical composition of essential oil of the chamomile [*Chamomilla recutita* (L.) Raeuchert] extracted for steam distillation. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 129-136, 2008.

BRAGA, F.G.; BOUZADA, M.L.M.; FABRI, R.L.; MATOS, M.O.; MOREIRA, F.O. COIMBRA, E.E.S. Leishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, n. 2, 4 p.396-402, 2007.

BROWN JÚNIOR, K. S. Engenharia ecológica: novas perspectivas de seleção e manejo de plantas medicinais. **Acta Amazônica**, v. 18, n. 01, p. 291-303, 1988.

CAPAZ, R.P.S. **Avaliação da rebrota de erva baleeira (*Varronia curassavica* jacq.) cultivada em Parnaíba, PI e Botucatu, SP, na produtividade de biomassa e teor de alfa-humuleno do óleo essencial**. 2017. 57 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agronomicas –UNESP, Botucatu, 2017.

CARVALHO JÚNIOR, P.M.; RODRIGUES, F.R.O; SAWAYA, A.C.H.F; MARQUES M.O.M; SHIMIZU, M.T. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, v.95, n.2/3, p.297-301, Dec. 2004.

CERQUEIRA, M.D.; MARQUES, E.J.; MARTINS, D.; ROQUE, N.F.; CRUZ, F.G.; GUEDES, M.L.S. Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). **Quimica Nova**. v. 32, p.1544-1548, 2009.

CRUZ, L.C.; OLIVEIRA, P.J.B.; LUCHESI, L.; MELLO, R.M.; RODRIGUES, M.F.F.; MARCHESE, J.A.; BUSSO, C. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cordia verbenacea* frente a quatro cepas bacterianas de interesse clínico. Mostra científica da pós-graduação da UTFPR, 2017.

DE CARVALHO JR, P.M.; RODRIGUES, R.F., SAWAYA, A.C.; MARQUES, M.O.; SHIMIZU, M.T. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, v.95, p. 297–301, 2004.

DEMÉTRIO, A.M. **Morfoanatomia da folha de *Varronia monosperma* (Cordiaceae)**. 2017. 40f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas), Departamento de Botânica, Universidade Federal de Santa Catarina., SC.

EVERT, Ray Franklin. **Anatomia das plantas de ESAU**. São Paulo: Blucher, 2013.

FONSECA, M.C.M., et al. Influência da época e do horário de colheita nos teores de óleo essencial e de taninos em couve-cravinho (*Porophyllum ruderale*) (Jacq.) Cassini. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, p. 75-79, 2007. Disponível em:<[http://www.ibb.unesp.br/servicos/publicacoes/rbpm/pdf\\_v9\\_n2\\_2007/artigo9\\_v9\\_n2\\_75-79.pdf](http://www.ibb.unesp.br/servicos/publicacoes/rbpm/pdf_v9_n2_2007/artigo9_v9_n2_75-79.pdf)>. Acesso em: 24 mai. 2017.

GOBBO-NETO, L; LOPES N.P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**. vol.30, n. 2, 2007.

GOMES, J.A.O. **Estudos complementares ao manejo do assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less.): fenologia, fitoquímica, histoquímica, anatomia e variação sazonal em população nativa**. 2017. 90f. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Estadual Paulista, SP.

GONELI, A.L.D.; NASU, A.K.; GANCEDO, R.; ARAÚJO, W.D.; SARATH, K.L.L. Cinética de secagem de folhas de erva baleeira (*Cordia verbenacea* DC.) **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.2, p.434-443, 2014.

GUIMARÃES, A.G.; XAVIER, M.A.; SANTANA, M.T.; CAMARGO, E.A.; SANTOS, C.A.; BRITO, F.A.; BARRETO, E.O.; CAVALCANTI, S.C.H.; ANTONIOLLI, A.R.; OLIVEIRA, R.C.M.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology** v.385, p.253–263, 2012.

GUZZO, E.C. Resistência de plantas e a bioecologia e nutrição dos insetos. In: **Panizzi, A.R. & J.R.P. Parra (Eds.). Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas**. Brasília DF: Embrapa Informação Tecnológica. p.1055-1105, 2009.

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

HERNANDEZ, T.; CANALES, M.; TERAN, B.; AVILA, O.; DURAN, A.; GARCIA, A.M.;  
HERNANDEZ, H.; ANGELES-LOPEZ, O.; FERNANDEZ-ARAIZA, M.; AVILA, G.  
Antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Cordia  
curassavica* (Boraginaceae) **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n.1, p.137-141,  
2014.

HOU, J.; SUN, T.; HU, J.; CHEN, S.; CAI, X.; ZOU, G Chemical composition, cytotoxic  
and antioxidant activity of the leaf essential oil of *Photinia serrulata*. **Food Chemistry  
in press**, 2006.

HOYOS, J.M.A.; ALVES, E.; ROZWALKA, L.C.; SOUZA, E.A.; ZEVIANI, W.M.  
Antifungal activity and ultrastructural alterations in *Pseudocercospora griseola* treated  
with essential oils. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 3, p. 270-284, 2012.

KAKARAPARTHI, P.S.; SRINIVAS, K.V.N.S.; KUMAR, J.K.; KUMAR, A.N.; KUMAR,  
A. Composition of herb and seed oil and antimicrobial activity of the essential oil of two  
varieties of *Ocimum basilicum* harvested at short time intervals. **Journal of Plant  
Development**, n.22, p. 59 – 76, 2015.

LADEIRA, S. R. **Preparação do Extrato Seco de Cordia verbenacea**.2002. 31f.  
Monografia (Fitoterapia) - Porto Alegre – RS, Instituto Brasileiro de Estudos  
Homeopáticos - Faculdade de Ciências da Saúde de São Paulo - IBEHE/FACIS, 2002.

LAMBERT, R.J.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J.; NYCHAS, G.J. A study of the  
minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol  
and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p. 453-462, 2001.

LEAL-COSTA, M.V.; AMÉLIA, R.P. Leaf anatomy of *Varronia curassavica* Jacq.  
(Cordiaceae). **Revista Fitos**, vol. 11, n.1, p. 1-118, 2017.

LEGAULT, J.; DAHL, W.; DEBITON, E.; PICHETTE, A.; MADELMONT, J.C. Antitumor  
activity of balsam fir oil: Production of reactive oxygen species induced by á-humulene  
as possible mechanism of action. **Plantas e Ervas Medicinais, Fitoterapia e  
Fitoterápicos.**, v.69, p. 402-407, 2003.



LETCHAMO, W.; MARQUARD, R. The pattern of active substances accumulation in camomile genotypes under different growing conditions and harvesting frequencies. **Acta Horticulturae**, n.331, p.357-61, 1993.

LORENZI H; MATOS FJA. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum, 2008.

MARQUES, A.P.S. **Produtividade e perfil químicos de óleo essencial de acessos de *Varronia curassavica* Jacq. em diferentes horários de coleta e período sazonal**. 2016. 74 pag. Universidade Estadual Paulista Julho de Mesquita filho. Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2016.

MARTINS, F.T.; SANTOS, M.H.; POLO, M.; BARBOSA, L.C.A. variação química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) poit. sob condições de cultivo. **Química nova**, v.29, p.1203,2006

MARTINS-DA-SILVA, R.C.V. Coleta e Identificação de Espécimes Botânicos. **Revista Embrapa**, 2002.

MATIAS, E.F.F.; ALVES, E.F. SILVA, M.K.N.; CARVALHO, V.R.A.; COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M. The genus *Cordia*: botanists, ethno, chemical and pharmacological aspects. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2015.

MECCIA, G.; ROJAS, L.B.; VELASCO, J.; DÍAZ, T.; USUBILLAGA, A.; ARZOLA, J.C.; RAMOS, S. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Cordia* 21 verbenacea from the Venezuelan Andes. **Natural Product Communication**, v. 4, n. 8, p.1119–1122, 2009.

MILLER, J.S.; GOTTSCHLING, M. Generic classification in the Cordiaceae (Boraginales): resurrection of the genus *Varronia* P. **Br. Taxon**, v. 56, p. 163-169, 2007.

MONTANARI, C.A; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**. v.24, n.1, p.105-111, 2001.

MORAIS, L. A. S. Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Org.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, cap.9, p.139-152, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MURAKAMI, S.; LI, W.; MATSUURA, M.; SATOU, T.; HAYASHI, S.; KOIKE, K. Composition and seasonal variation of essential oil in *Alpinia zerumbet* from Okinawa Island. **Journal of Natural Medicines**, v.63, p.204-208, 2009.

MURAKAMI, S.; LI, W.; MATSUURA, M.; SATOU, T.; HAYASHI, S.; KOIKE, K. Composition and seasonal variation of essential oil in *Alpinia zerumbet* from okinawa island. **Journal of natural medicines**, v.63, p.204-208, 2009.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, M.G; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**. v. 66, p.1022-1037, 2004.

NIZIO, D.A.C. **Estudo fitoquímico e atividades antifúngica e antiprotozoária do óleo essencial de genótipos de erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.)**. 2015.109 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Universidade Federal de Sergipe, SE.

OLIVEIRA, A.R.M.F.; JEZLER, C.N.; OLIVEIRA, R.C.; COSTA, L.C.B. Influence of plant age on production and quality of essential oil of peppermint. **Revista Ceres**, v.59 n.2,2012.

OLIVEIRA, D.M.C.; LUCHINIA, A.C.; SEITOC, L.N.; GOMESA, J.C.; LÓPEZ, M.E.C.; DI STASI, L.C. *Cordia verbenacea* and secretion of mast cells in different animal species. **Journal of Ethnopharmacology** , v.135 , P. 463–468, 2011.

OZKAN, G.; BAYDAR, H.; ERBAS, S. The influence of harvest time on essential oil composition, phenolic constituents and antioxidant properties of Turkish oregano (*Origanum onites* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 90, p. 205–209, 2010.

PARISOTTO, E.B. **Avaliação da atividade antitumoral do extrato bruto e supercrítico de *Cordia verbenacea***. 2011. 88 pag. Dissertação (Graduação em Bioquímica) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC.

PASSOS, G.F.; FERNANDES, E.S.; CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L.F.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**. n.110, p.323–333, 2007.

PEREIRA, J.A.S. **Avaliação da variabilidade do metabolismo secundário em *Cordia verbenacea* DC.** 2017. 158f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, SP.

PEREIRA, J.A.S. ***Cordia verbenacea* DC.: perfil morfo-anatômico, histoquímico, farmacognóstico e avaliação da atividade anti-candida do extrato hidroetanólico e suas frações.** 2013. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP, Araraquara, SP, 2013.

PINHO, L., SOUZA, P. N. S., SOBRINHO, E.M., ALMEIDA, A. C., MARTINS, E. R. Antimicrobial activity of hydroalcoholic extracts from rosemary, peppertree, barbatimão and erva-baleeira leaves and from pequi peel meal. **Ciência Rural**, v. 42, p.326-331, 2012.

PINTO, V.S. **Influência da idade da planta na composição química do óleo essencial de *Lippia alba* e de um ciclo de seleção recorrente na atividade formicida.** 2017. 66f. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade) - Universidade Federal de Sergipe, SE.

PORTAL BRASIL. **Ministério da Saúde.** Uso de plantas medicinais e fitoterápicos sobe 161%. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2016/06/uso-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-sobe-161>>. Acesso em: 20 maio 2017.

QUEIROZ, T.B.; MENDES, A.D.R.; SILVA, J.C.R.L.; FONSECA, F.S.A.; MARTINS, E.R. Teor e composição química do óleo essencial de erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.) em função dos horários de coleta. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.**, Campinas, v.18, n.1, supl. I, p.356-362, 2016.

RODRIGUES, F.F.G.; OLIVEIRA, L.G.S.; SARAIVA, M.E.; ALMEIDA, S.C.X.; MARIO E. S.; CAMPOS, A.R.; COSTA, J.G.M. Chemical composition, antibacterial

and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. **Pharmacognosy Research** , v.4 , n. 3, 2012

ROMDHANE, M.; TIZAOUI, C. The kinetic modeling of a steam distillation unit for the extraction of aniseed (*Pimpinella anisum*) essential oil. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 80, p. 759-766, 2005.

SANTOS, M.R.A.; FERNANDES, C.F.; INNECO, R. Efeitos da adubação orgânica na produção de biomassa e óleo essencial de *Lippia alba*. **Folhetos da EMBRAPA**. 2004.

SARTO, M.P.M.; ZANUSSO JUNIOR, G. Antimicrobial activity of essential oil. **Revista Uninga**, v.20, n.1, p. 98-111, 2014.

SARTOR, R.B. **Modelagem, simulação e otimização de uma unidade industrial de extração de óleos essenciais por arraste a vapor**. 2009. 99f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS.

SCIARRONE, D.; GIUFFRIDA, D. B.; ROTONDO, A. B.; MICALIZZI G. A.; ZOCCALI, M. C.; PANTÒC S.; DONATO P. B.; RODRIGUES-DAS-DORES R. G. D.; MONDELLO, L. Quali-quantitative characterization of the volatile constituents in *Cordia verbenacea* D.C. essential oil exploiting advanced chromatographic approaches and nuclear magnetic resonance analysis. **Journal of Chromatography**, 2017.

SILVA, A.C.; SOUZA, P.E.; MACHADO, J.C.; SILVA JR., B.M.; PINTO, J.E.B.P. Effectiveness of essential oils in the treatment of *Colletotrichum truncatum*-infected soybean seeds. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 5, p. 305-313, 2012.

SILVA, A.C.; SOUZA, P.E.; RESENDE, M.L.V.; SILVA JR., M.B.; RIBEIRO JR., P.M.; ZEVIANI, W.M. Local and systemic control of powdery mildew in eucalyptus using essential oils and decoctions from traditional Brazilian medicinal plants. **Forest Pathology**, v. 44, p. 145–153, 2014.

SILVA, S.L.; FIGUEIREDO, P.M.; YANO T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Leaves. **Acta Amazonica**. vol. 37, n.2, p. 281 – 286, 2007.

SOUZA, M.F.; SILVA, P.N.; PARREIRAS, N.S.; SOUZA, S.A.M.; OLIVEIRA, J.R.; NUNES, J.D.; ALVARENGA, I.C.A.; MARTINS, E.R.; COSTA, C.A. Teor de óleo essencial de *Cordia verbenacea* em função da orientação geográfica e do dossel. **Horticultura brasileira**, v. 27, n. 2, 2009.

SOUZA, M.I.L. **Influência do pré-tratamento com ultrassom na quantidade e qualidade do óleo essencial de *Varronia curassavica* Jacq.**, *Lippia origanoides* Kunth. e *Ocimum gratissimum* L. 2016. 83f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, MG.

SUFFINESS, M.; PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. Methods in Plant Biochemistry.:**Assays Bioactivity**, v.6, p.71-133,1990.

SYLVESTRE, M.; PICHETTE, A.; LONGTIN, A.; NAGAU, F.; LEGAULT, J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **Journal of Ethnopharmacoly**, v.103, p. 99-102, 2006

VENTRELLA, M.C; MARINHO, C.R. Morphology and histochemistry of glandular trichomes of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) leaves. **Revista Brasileira de Botânica**, v.31, n.3, p.457- 467, 2008.

VIEIRA, D. D.; CONCEIÇÃO, A. S.; MELO, J. I. M.; STAPF, M. N. S. A família Boraginaceae sensu lato na APA Serra Branca/Raso da Catarina, Bahia, Brasil. **Rodriguésia**, v. 64, n. 1, p.151-168. 2013.