

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Química



Dissertação

**Caracterização Química e Avaliação da Capacidade
Antioxidante e Antifúngica dos Óleos Essenciais de
Tagetes minuta L. cultivada em Pelotas-RS**

Daniela Hartwig de Oliveira

Pelotas, Fevereiro de 2013.

Daniela Hartwig de Oliveira

**Caracterização Química e Avaliação da Capacidade
Antioxidante e Antifúngica dos Óleos Essenciais de *Tagetes*
minuta L. cultivada em Pelotas, RS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal
de Pelotas como requisito parcial
para à obtenção do título de
Mestre em Ciências (área do
conhecimento: Química)

Orientadora: Prof^a Dr^a. Raquel Guimarães Jacob

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a. Lucielli Savegnago

Pelotas, Fevereiro de 2013.

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado intitulada “Caracterização Química e Avaliação da Capacidade Antioxidante e Antifúngica dos Óleos Essenciais de *Tagetes minuta* L. cultivada em Pelotas, RS”, de autoria de Daniela Hartwig de Oliveira.

Banca Examinadora:

.....
Prof^a. Dr^a. Raquel Guimarães Jacob – UFPel

.....
Prof. Dr. Eder João Lenardão – UFPel

.....
Prof. Dr. William Peres - UFPel

Aos meus pais, Aires e Leci, ao meu irmão Tálisson pela força, incentivo, amor, amizade, e compreensão. Sempre o meu eterno agradecimento pelos esforços para que eu pudesse concluir os meus estudos.

Ao Julio meu esposo que sempre esteve presente com muita paciência e muito amor, incentivando e colaborando para a realização deste trabalho, muito obrigada.

A minha querida e amada filha Camila, que com seus constantes sorrisos e carinhos serviram de incentivo e alento nas horas mais difíceis, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me permitir chegar até aqui e ser tão presente em minha vida.

À Prof^a. Dr^a. Raquel Guimarães Jacob pela paciência, confiança, amizade, orientação e ensinamentos concedidos.

À Prof^a. Dr^a. Lucielli Savegnago pela confiança, oportunidade, orientação e ensinamentos concedidos.

Aos Profs. Drs. Diego Alves, Eder João Lenardão e Gelson Perin pelos ensinamentos, confiança, oportunidades e orientação dedicados no período do mestrado.

Ao Prof. Dr. Gustavo Schiedeck pelo fornecimento das plantas utilizadas neste trabalho.

Aos colegas do laboratório Katiúcia, Edmilson e Renata que sempre me apoiaram e ajudaram.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia, especialmente a Micheli, Débora e Francine, por toda amizade, ajuda e companheirismo.

Aos meus colegas de mestrado pela amizade, conhecimento e companheirismo.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

A todos os demais colegas de laboratório pela ajuda e cooperação.

A todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram para a finalização dessa conquista.

RESUMO

Titulo: Caracterização Química e Avaliação da Capacidade Antioxidante e Antifúngica dos Óleos Essenciais de *Tagetes minuta* L. cultivada em Pelotas, RS.

Autora: Daniela Hartwig de Oliveira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Raquel Guimarães Jacob

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucielli Savegnago

A composição química dos óleos essenciais (OEs) da planta *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) cultivada em Pelotas, Região Sul do Brasil, foi estudada e os resultados obtidos apresentaram diferenças significativas quando comparados aos OEs obtidos a partir de plantas cultivadas nos estados do Nordeste do Brasil e de outras partes do mundo. Os OEs obtidos a partir das flores e folhas de *T. minuta* foram analisados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa, seguido pelo cálculo dos índices de Kovats (KI) e também mostraram diferenças na composição química. O rendimento do óleo essencial extraído das flores foi de 2,09% (m/m), enquanto que para as folhas foi de 0,33% (m/m). O constituinte majoritário identificado no OE das flores foi (*Z*)-tagetona (70%), enquanto que o óleo essencial das folhas é rico em dihidrotagetona (57%) e (*Z*)-tagetona (22%). Os OEs, principalmente o extraído das flores, apresentaram efeitos significativos em ensaios que avaliaram sua capacidade antioxidante “*in vitro*”, frente aos ensaios de neutralização dos radicais DPPH, ABTS e óxido nítrico, avaliação do potencial redutor do íon férrico e frente à peroxidação lipídica num ensaio contendo uma emulsão de ácido linoléico. Os OEs das flores e folhas também foram ativos contra todos os fungos testados *T. asahii*, *C. parapsilosis*, *C. lipolytica* e *C. guilhermondi*, apresentando resultados semelhantes, no ensaio, aos observados para o controle positivo fluconazol.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Dissertação de Mestrado em Química
Pelotas, Fevereiro de 2013.

ABSTRACT

Title: Chemical Characterization and Evaluation of Antifungal and Antioxidant capacity of Essential oils from *Tagetes minuta* L. grown in Pelotas, RS.

Author: Daniela Hartwig de Oliveira

Academic Advisor: Prof^a. Dr^a. Raquel Guimarães Jacob

Co-Academic Advisor: Prof^a. Dr^a. Lucielli Savegnago

The chemical composition of essential oils (EOs) produced from *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) grown in Pelotas, Southern Brazil, was studied and showed great differences between the oils obtained from northeastern Brazil and from other parts of the world. The EOs from flowers and leaves were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry followed by calculation of Kovats indices (KI) and also showed differences in their chemical composition. The yield of EO was 2.09% (w/w) from flowers and 0.33% (w/w) from leaves. EO from flowers contains mainly (Z)-tagetone (70%), while the EO from leaves is rich in dihydrotagetone (57%) and (Z)-tagetone (22%). The EOs, mainly from flowers, showed significant effects in assays which evaluated their antioxidant capacity “*in vitro*” to assays of the neutralization of the radical DPPH, ABTS and nitric oxide, evaluation of the potential of reducing ferric ion and facing lipid peroxidation an assay containing an emulsion of linoléico acid. The EOs of flowers and leaves were also active against all fungi tested *T. asahii*, *C. parapsilosis*, *C. lipolytica*, and *C. guilhermondi*, with similar results, in the test, those observed for the positive control fluconazole.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Master Dissertation in Chemistry
Pelotas, February, 2013.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
ÍNDICE DE TABELAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xv

Introdução e Objetivos	1
-------------------------------------	----------

<u>Capítulo 1: Revisão Bibliográfica</u>	6
---	----------

1.1 Plantas Medicinais	7
1.1.1 Família Asteraceae.....	8
1.1.2 Gênero <i>Tagetes</i>	8
1.1.3 A espécie <i>Tagetes minuta</i> Linn.....	9
1.2. Óleos Essenciais.....	11
1.2.1 Óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> Linn	15
1.2.2 Caracterização química de óleos essenciais.....	18
1.2.3 Propriedades biológicas apresentadas por óleos essenciais.....	20
1.2.3.1 Atividade antifúngica dos óleos essenciais.....	20
1.2.3.2 Atividade antioxidante dos óleos essenciais.....	22
1.2.3.3 Propriedades biológicas apresentadas pela planta <i>T. minuta</i>	24

<u>Capítulo 2: Apresentação e Discussão dos Resultados</u>	29
---	-----------

2.1 Coleta do material vegetal.....	30
2.2. Extração dos óleos essenciais	30
2.3 Caracterização química dos óleos essenciais de <i>Tagetes minuta</i> Linn.....	31
2.3.1 Óleo essencial das flores de <i>T. minuta</i>	31
2.3.2 Óleo essencial das folhas de <i>T. minuta</i>	37
2.3.1. Comparação entre os óleos essenciais das flores e folhas de <i>T. minuta</i>	42

2.4 Isolamento dos compostos majoritários presentes no óleo essencial das flores e folhas de <i>T. minuta</i>	46
2.4.1 Obtenção da (Z)-tagetona a partir do óleo essencial das flores de <i>T. minuta</i>	46
2.4.2 Obtenção da di-hidrotagetona a partir do óleo essencial das folhas de <i>T. minuta</i>	48
2.5 Determinação de parâmetros antioxidantes "in vitro" dos óleos essenciais das flores e folhas de <i>T. minuta</i>	49
2.5.1 Ensaios sem tecido animal.....	50
2.5.2 Ensaios com tecido animal.....	61
2.6 Avaliação da capacidade antifúngica do óleo essencial das flores e folhas de <i>T. minuta</i>	66
Considerações Finais e Conclusão	69
<u>Capítulo 3: Parte Experimental</u>	73
3.1 Materiais e Métodos	74
3.1.1 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de massas	74
3.1.2 Espectrometria no infravermelho	74
3.1.3 Análise estatística	74
3.1.4 Solventes e Reagentes	75
3.1.5 Animais e Material Biológico	75
3.2 Procedimentos Experimentais	75
3.2.1 Amostragem.....	75
3.2.2 Tratamento da amostra	76
3.2.3 Extração do óleo essencial	76
3.2.4 Análise cromatográfica em CG-MS	77
3.2.5 Cálculo do Índice de Kovats.....	77
3.2.6 Determinação de parâmetros antioxidantes "in vitro" dos óleos essenciais das flores e folhas de <i>T. minuta</i>	78
3.2.6.1 Ensaios sem tecido animal.....	78
3.2.6.2 Ensaios com tecido animal.....	83
3.2.7 Determinação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de <i>T. minuta</i>	85

Referências Bibliográficas	86
<u>Capítulo 4: Espectros Selecionados</u>	94
Apêndices.....	98
Apêndice A: Estruturas dos terpenos.....	99

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Formação dos compostos terpênicos relacionados a unidades de isopreno.....	14
Tabela 2. Composição química do óleo essencial obtido por destilação por arraste a vapor das flores de <i>T. minuta</i>	32
Tabela 3. Dados do espectro de massas dos compostos presentes no óleo essencial das flores de <i>T. minuta</i>	35
Tabela 4. Composição química do óleo essencial obtido por destilação por arraste a vapor das folhas de <i>T. minuta</i>	38
Tabela 5. Dados do espectro de massas dos compostos presentes no óleo essencial das folhas de <i>T. minuta</i>	39
Tabela 6. Compostos majoritários presentes nos óleos essenciais de <i>T. minuta</i>	45
Tabela 7. Efeito dos óleos essenciais das flores e folhas de <i>T. minuta</i> no ensaio de neutralização dos radicais hidroxila.....	54
Tabela 8. Efeito dos óleos essenciais das flores e folhas de <i>T. minuta</i> no ensaio Superóxido-dismutase <i>in vitro</i>	59
Tabela 9. Concentração inibitória mínima observada para os óleos essenciais das flores e folhas de <i>T. minuta</i> no ensaio de atividade antifúngica.....	67
Tabela 10: Dados meteorológicos da localidade de cultivo de <i>T. minuta</i>	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. (a) Folhas, (b) Flores e (c) sementes de <i>T. minuta</i>	10
Figura 2. Compostos terpênicos e terpenóides	13
Figura 3. Precursores dos terpenóides.....	13
Figura 4. Estruturas dos compostos majoritários presentes nos óleos essenciais de <i>T. minuta</i>	16
Figura 5. Cromatograma do óleo essencial das flores de <i>T. minuta</i>	31
Figura 6. Espectro de massas do composto (<i>Z</i>)-tagetona.....	33
Figura 7. Possível mecanismo de fragmentação do composto (<i>Z</i>)-tagetona.....	34
Figura 8. Espectro de massa do composto (<i>Z</i>)- β -ocimeno.....	34
Figura 9. Espectro no infravermelho do óleo essencial das flores de <i>T. minuta</i>	36
Figura 10. Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>T. minuta</i>	37
Figura 11. Espectro de massas do composto di-hidrotagetona.....	40
Figura 12. Possível mecanismo de fragmentação do composto di-hidrotagetona.....	40
Figura 13. Espectro de massas do composto (<i>E</i>)-tagetona.....	41
Figura 14. Espectro no infravermelho do óleo essencial das folhas de <i>T. minuta</i>	41
Figura 15. Cromatograma e espectro de massas do composto (<i>Z</i>)-tagetona.....	47
Figura 16. Espectro no infravermelho do composto (<i>Z</i>)-tagetona.....	47
Figura 17. Cromatograma e espectro de massas do composto di-hidrotagetona.....	49
Figura 18. Reação entre DPPH [•] e o antioxidante para formar DPPH-H.....	50
Figura 19. Efeito dos óleos essenciais das flores e folhas de <i>T. minuta</i> no ensaio de neutralização dos radicais DPPH.....	51
Figura 20. Efeito dos óleos essenciais das flores e folhas de <i>T. minuta</i> no ensaio de neutralização dos radicais ABTS ^{•+}	53
Figura 21. Efeito dos óleos essenciais das flores e folhas de <i>T. minuta</i> no ensaio de neutralização dos radicais óxido nítrico.....	55
Figura 22. Representação da redução do complexo Fe ³⁺ -TPTZ a Fe ²⁺ -TPTZ.....	56
Figura 23. Efeito dos óleos essenciais das flores e folhas de <i>T. minuta</i> no ensaio do potencial redutor do íon férlico (FRAP).....	57

Figura 24. Efeito dos óleos essenciais das flores de <i>T. minuta</i> na determinação do potencial quelante do íon ferroso.....	58
Figura 25. Ensaio dos óleos essenciais das flores e folhas de <i>T. minuta</i> frente ao ensaio da peroxidação lipídica.....	60
Figura 26. Efeito dos óleos essenciais das flores e folhas de <i>T. minuta</i> no ensaio da enzima δ-ALA-D no fígado de ratos.....	61
Figura 27. Efeito dos óleos essenciais das flores e folhas de <i>T. minuta</i> no ensaio da enzima δ-ALA-D no rim de ratos.....	62
Figura 28. Efeito dos óleos essenciais das folhas de <i>T. minuta</i> no ensaio de TBARS nos tecidos cerebrais de ratos.....	64
Figura 29. Efeito dos óleos essenciais das folhas de <i>T. minuta</i> no ensaio de TBARS nos tecidos fígado (a) e rim (b) de ratos.....	65
Figura 30. Efeito dos óleos essenciais das flores de <i>T. minuta</i> no ensaio de TBARS nos tecidos cerebrais de ratos.....	65
Figura 31. Efeito dos óleos essenciais das flores de <i>T. minuta</i> no ensaio de TBARS nos tecidos fígado (a) e rim (b) de ratos.....	66
Figura 32. Mini-extrator de óleos essenciais da bancada.....	77
Figura 33. Determinação do potencial antioxidante <i>in vitro</i> dos óleos essenciais das flores e folhas de <i>T. minuta</i>	78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
EM	Espectrometria de massas
m/z	Razão Massa/Carga
OE	Óleos essencial
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono ¹³
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio ¹
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
δ-ALA-D	δ-aminolevulinato desidratase
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GSH	Glutationa reduzida
GPx	Glutationa peroxidase
MDA	Malondialdeído
NPS	Nitroprussiato de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato hidrogênio
ATP	Adenosina trifosfato
PL	Peroxidação lipídica
RL	Radical livre
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ER	Espécies reativas
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Introdução e Objetivos

1. Introdução

Ao longo dos tempos o homem percebeu, de alguma forma, a presença de algo nas plantas que, administrado sob a forma de uma mistura complexa ou como substância pura isolada, tem a capacidade de resultar na recuperação da saúde. Este princípio ativo, seja ele constituído de uma única substância existente na planta ou de um conjunto de substâncias que atuam sinergicamente, é chamado de complexo fitoterápico. Essas substâncias podem ser empregadas na forma de preparações caseiras, como infusões, tinturas e pós, ou na forma de composto puro e isolado da planta, transformado pela indústria farmacêutica (Elisabetsky & Wannmacher, 1993; Melo et al., 2002; Lorenzi et al., 2008). Assim, as plantas medicinais podem servir como alternativas auxiliares ao tratamento convencional, visando diminuir custos e os efeitos colaterais ocasionados por alguns medicamentos.

Outra fonte de pesquisa que vem crescendo, é o estudo das potencialidades biológicas de óleos essenciais (OEs) extraídos de plantas medicinais e aromáticas. Os OEs são constituídos por uma mistura complexa de substâncias naturais, que são responsáveis pelas funções de adaptação e defesa da planta no meio ambiente (Bakkali et al., 2008). Esses compostos provenientes do metabolismo secundário das plantas despertam interesse ao homem moderno, principalmente por sua potencialidade em se tornar um produto terapêutico (Briskin, 2000). Na literatura são descritos diversos estudos referentes as propriedades biológicas atribuídas aos óleos essenciais, dentre as quais destacam-se a ação antinociceptiva, anticancerígena (Ozen et al., 2011), antiviral (Gulcin et al., 2010), antibacteriana (Yu et al., 2011) e antioxidante (Victoria et al., 2012), por exemplo.

A escolha do material vegetal a ser estudado, na maioria das vezes, está relacionada com as plantas que são utilizadas na medicina popular tradicional. São desenvolvidos diferentes trabalhos para avaliar e identificar as potencialidades biológicas e a toxicidade da planta estudada.

Uma das plantas que vem se destacando nos últimos anos, com relação ao estudo de suas propriedades biológicas é a planta *Tagetes minuta* Linn. Esta planta aromática que pertence ao gênero *Tagetes* e à família Asteraceae é nativa da América do Sul (Chamorro et al., 2008; Upadhyaya, et al., 2010). A sua facilidade de

adaptação permitiu que se disseminasse em outras regiões como Europa, Ásia, África, Índia, Madagascar e Havaí (Soule, 1993). No Brasil, o “chinchilo”, como a planta é conhecida, pode ser encontrada principalmente nos estados do Nordeste e também tem sido cultivada em algumas partes do Sudeste e do Sul do país (Souza et al., 2000; Craveiro et al., 1997).

A *Tagetes minuta* L. tem despertado amplo interesse dos pesquisadores, pois, na medicina popular tem sido amplamente utilizada para tratar verminoses, dores intestinais, reumatismos, resfriados, estimular o fluxo menstrual (Lorenzi et al., 2008), além de ser empregada na agricultura como um biocida (Chamorro et al., 2008). As partes aéreas desta planta são comercializadas em alguns estados da África, e consumidas como chás em função de suas propriedades biológicas (Katerere et al., 2012). Os extratos aquosos e metanólicos apresentam atividades antioxidante e antibacteriana, por exemplo, (Shetty et al., 2010; Katerere et al., 2012). Com relação ao seu óleo essencial, na literatura estão descritas algumas aplicações, destacando-se a sua utilização na indústria de perfumaria e também como biocida e herbicida natural (Chamorro et al., 2008).

A composição química do óleo essencial de *T. minuta* está bem documentada na literatura e varia muito de acordo com a localização geográfica em que a planta foi coletada, e também de acordo com a parte da planta da qual foi extraído o óleo essencial, o que interfere significativamente nas propriedades biológicas apresentadas pelo mesmo (Craveiro et al., 1998; Garg & Mehta, 1998; Zygaldo et al., 1995; Gil et al., 2000; Chamorro et al., 2008).

No Brasil, há apenas um trabalho que relata a composição química do OE da *T. minuta* cultivada no Nordeste do país (Craveiro et al., 1998). Entretanto, até o momento, não existem trabalhos que descrevam o estudo da composição química dos óleos essenciais da planta cultivada na Região Sul. Portanto, realizar estudos relacionados ao óleo essencial de *T. minuta* obtido de plantas cultivadas em Pelotas, se faz necessário para avaliar e identificar as suas possíveis potencialidades biológicas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Considerando os dados descritos na literatura, onde são atribuídas à planta *T. minuta* diferentes propriedades biológicas, e reconhecendo que não existem relatos até o presente momento sobre o estudo do óleo essencial extraído desta planta cultivada na Região Sul do Brasil, o objetivo deste trabalho é extrair e caracterizar quimicamente os óleos essenciais das flores, folhas e caules de *T. minuta* cultivada em Pelotas, além de avaliar a ação antifúngica e a capacidade antioxidante destes óleos essenciais.

2.2 Objetivos Específicos

1. Coletar, separar, secar e extrair o óleo essencial das flores, folhas e caules de *T. minuta*;
2. Identificar e quantificar os compostos químicos presentes nos óleos essenciais extraídos das flores, folhas e caules de *T. minuta*;
3. Determinar parâmetros antioxidantes dos óleos essenciais das flores e folhas de *T. minuta* em análises “in vitro”, nos ensaios de neutralização dos radicais 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS^{•+}), radical hidroxila (OH[•]) e radical óxido nítrico (•NO);
4. Determinar o potencial dos óleos essenciais de *T. minuta* em reduzir o íon férrico (Fe³⁺) presentes em solução (FRAP), bem como avaliar o potencial quelante dos óleos essenciais frente ao íon ferroso (Fe²⁺);
5. Avaliar a interação dos óleos essenciais das flores e folhas de *T. minuta* frente a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e δ-Aminolevulinato Desidratase (δ-ALA-D);

6. Analisar a capacidade dos óleos essenciais das flores e folhas de *T. minuta* em reduzir a peroxidação lipídica em um sistema contendo emulsão de ácido linoléico;
7. Avaliar o dano oxidativo dos óleos essenciais das flores e folhas de *T. minuta* no tecido de estruturas cerebrais (córtex, hipocampo e cerebelo), fígado e rim de ratos em ensaios “in vitro” pela determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS – basal);
8. Verificar a capacidade antifúngica dos óleos essenciais das flores e folhas de *T. minuta* frente às cepas de *Candida guilhermondi*, *Candida lipolytica*, *Candida parapsilosis* e *Trichosporon Asahi*.

Capítulo 1

Revisão Bibliográfica

1.1 Plantas Medicinais

O emprego de plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos desde as formas mais simples de tratamento local, provavelmente utilizada pelo homem das cavernas, até as formas tecnologicamente sofisticadas de fabricação industrial utilizada pelo homem moderno. Entretanto, apesar das diferenças entre essas maneiras de uso, há um fato em comum entre elas: em ambos os casos o homem percebeu, de alguma forma, a existência de algo nas plantas que, administrado sob a forma de uma mistura complexa ou como substância pura isolada, tem a propriedade de provocar reações benéficas no organismo, capazes de resultar na recuperação da saúde. Este princípio ativo, seja ele constituído de uma única substância existente na planta ou de um conjunto de substâncias que atuam sinergicamente, é chamado de complexo fitoterápico. Essas substâncias podem ser empregadas na forma de preparações caseiras, como chás, tinturas e pós, ou na forma de composto puro e isolado da planta, transformado pela indústria farmacêutica (Elisabetsky & Wannmacher, 1993; Melo et al., 2002; Lorenzi et al., 2008). Além disto, o estudo das potencialidades biológicas de óleos essenciais extraídos de plantas medicinais e aromáticas, as quais têm indicado potencial de controle de fitopatógenos, ação antioxidante, alelopática, anestésica, entre outras tem se tornado uma fonte crescente de pesquisa (Bakkali et al., 2008).

Com relação às plantas medicinais, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda aos órgãos responsáveis pela saúde pública de cada país, que: a) façam levantamentos regionais de plantas utilizadas na medicina popular tradicional e identifique-as botanicamente; b) estimulem e recomendem o uso daquelas que tiverem comprovadas sua eficácia e segurança terapêuticas; c) desaconselhem o emprego das práticas da medicina popular consideradas inúteis ou prejudiciais; d) desenvolvam programas que permitam cultivar e utilizar as plantas selecionadas na forma de preparações dotadas de eficácia, segurança e qualidade (Lorenzi et al., 2008).

Assim, as plantas medicinais podem servir como alternativas auxiliares ao tratamento convencional, visando diminuir custos e os efeitos colaterais ocasionados por alguns medicamentos. A escolha do material vegetal a ser estudado, na maioria das vezes, está relacionada com as plantas que são utilizadas na medicina popular tradicional. Dessa forma, a planta *Tagetes minuta* Linn, que pertence ao gênero

Tagetes e a família Asteraceae, tem despertado amplo interesse dos pesquisadores, uma vez que existem diferentes relatos de sua utilização para tratar reumatismos, dores intestinais, para expelir vermes, estimular o fluxo menstrual (Lorenzi et al., 2008), além de ser empregada na agricultura como um biocida (Chamorro et al., 2008). Cabe ressaltar ainda que, as partes aéreas desta planta são comercializadas em alguns estados da África, e consumidas como chás em função de suas propriedades biológicas (Katerere et al., 2012).

1.1.1 Família Asteraceae

A Asteraceae é uma das famílias que se destacam na produção de compostos de defesas, frente a sistemas invasores, os quais são produzidos por metabólitos secundários, o que justificaria sua ampla distribuição em diferentes regiões do globo terrestre. A família Asteraceae possui cerca de 1500 gêneros e é composta por aproximadamente 23.000 espécies. As plantas que compõem esta família são de caráter variado, porém cerca de 95% dos gêneros são constituídos por plantas de porte herbáceo e arbustivo e são encontradas em todos os tipos de *habitats*, mas principalmente nas regiões tropicais montanhosas da América do Sul (Onofre et al., 2008).

A família Asteraceae apresenta um grande número de espécies com potencial terapêutico, as quais podem ser utilizadas como anti-inflamatórios, antiparasíticas, fungicida, bactericida, entre outras. Estas ainda podem ser utilizadas na indústria de perfumes, medicamentos, cosméticos e de alimentos (Vittori et al., 2009; Villarreal et al., 1994; Olas et al., 2010).

1.1.2 Gênero *Tagetes*

O gênero *Tagetes* pertence à família Asteraceae, é representado por ervas aromáticas e também por plantas herbáceas de caráter ornamental, são popularmente conhecidas como malmequeres. As partes aéreas destas plantas têm sido amplamente utilizadas como plantas ornamentais, em rituais religiosos e com fins medicinais ao longo dos tempos (López et al., 2011).

De acordo com a classificação botânica, o gênero *Tagetes*, pertence ao:

- Reino: Plantae;
- Divisão: Magnoliophyta;
- Classe: Magnoliopsida;
- Ordem: Asterales;
- Família: Asteraceae;
- Sub-família: Helenieas;
- Gênero: *Tagetes*;
- Espécies: *Tagetes erecta*, *Tagetes filifolia*, *Tagetes lacera*, *Tagetes lúcida*, *Tagetes minuta*, *Tagetes pátula*, *Tagetes Tenuifolia* e numerosos híbridos.

Os estudos realizados com espécies deste gênero na Argentina, Índia, Brasil, e em outros países, tem relatado que a composição química do óleo essencial destas plantas varia de acordo com a localização geográfica de onde as amostras foram recolhidas (Craveiro et al., 1998; Garg & Mehta, 1998; Chamorro et al., 2008). Outros estudos, também descrevem importantes atividades biológicas relacionadas as plantas deste gênero, tais como atividade antimicrobiana, antioxidante, alelopática, inseticida, larvicida, repelente, entre outras (López et al., 2000; Zygadlo et al., 2005; Dharmagadda et al., 2005). Entretanto, é válido ressaltar ainda que existem poucos relatos referentes à avaliação da toxicidade apresentada por plantas deste gênero, sendo necessária a continuação dos estudos sobre o mesmo.

1.1.3 A espécie *Tagetes minuta* Linn

A *Tagetes minuta* L. é uma planta nativa e anual encontrada nas pastagens montanhosas do Sul da América do Sul. Na Argentina, a planta tornou-se bastante conhecida, sendo denominada popularmente como “Chinchilla” e, diversos relatos na literatura reportam a sua aplicabilidade (Gil et al., 2000; Zygadlo et al., 2003; Singh et al., 2007). No Brasil, alguns estudos foram desenvolvidos na região Nordeste do país (Craveiro et al., 1988) para avaliar a composição química do óleo essencial das flores desta espécie, a qual foi introduzida aqui há muitos anos. “Chinchilla” também pode ser conhecida por estrondo, chinchilho, rabo-de-rojão, Coari, Coari-bravo, erva-fedorenta, alfinete-do-mato, entre outros (Lorenzi et al., 2008).

A planta é um subarbusto anual, ereto, pouco ramificado, malcheiroso, de 1-2 metros de altura, nativo de áreas abertas da América do Sul, incluindo todo território brasileiro. A planta apresenta folhas compostas imparipinadas (número ímpar de folíolos), com 3 a 9 folíolos glândulosos conforme Figura 1a. As flores são dispostas em pequenos capítulos florais (conjunto de flores estreitamente agrupadas, os quais parecem constituir apenas uma só flor) amarelos, reunidos em panículas axiliares e terminais, onde as flores estão dispostas em vários eixos sustentadas por um eixo principal, Figura 1b (Lorenzi et al., 2008).



Figura 1. a) folhas, b) flores e c) semente de *Tagetes minuta*.

T. minuta é uma planta reproduzida por semente Figura 1c, com germinação na primavera e verão na região sul do Brasil, seu ciclo até a formação de sementes ocorre entre 120 a 150 dias. Sua ocorrência se dá em terrenos secos, porém seu desenvolvimento é melhorado quando cultivado em solos com atividade agrícola e de boa fertilidade (Souza et al., 2000), onde cresce espontaneamente sendo considerada uma “planta daninha” (Lorenzi et al., 2008). Entretanto, quando cultivada em pequenas quantidades, *T. minuta* pode apresentar alguns benefícios tanto para a agricultura familiar quanto para o seu uso como planta medicinal. Há estudos que indicam que as raízes desta planta podem liberar no solo substâncias que destroem algumas espécies de nematoides prejudiciais a algumas culturas agrícolas. Já as partes aéreas desta planta, têm sido empregadas na medicina popular no interior do Brasil, onde é considerada aromática excitante e diurética, sendo também utilizadas para o tratamento de reumatismo, dores intestinais, dispepsia, para expelir vermes e estimular o fluxo menstrual (Lorenzi et al., 2008).

1.2 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são de maneira geral misturas complexas, obtidas de produtos naturais. São constituídos por substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas, líquidas e de baixo peso molecular que são formados a partir dos metabólitos secundários de plantas aromáticas. São os princípios odoríferos encontrados em diferentes partes da planta, sendo os responsáveis pelas funções de adaptação e defesa da planta no meio ambiente (Bakkali et al., 2008). Estão localizados em estruturas secretoras especializadas das plantas, as quais podem ser cavidades, canais oleíferos, células parenquimáticas, bolsas lisígenas ou esquizolisígenas e pêlos glandulares (Onofre et al., 2008).

Na natureza, desempenham um papel importante na proteção das plantas como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra animais herbívoros, atuando na diminuição do apetite para essas plantas. Estas substâncias odoríferas, também são responsáveis por atrair alguns insetos desejáveis, para favorecer a dispersão do pólen e sementes garantindo assim a multiplicação e sobrevivência de sua espécie, ou então para repelir outros animais indesejáveis (Bakkali et al., 2008).

Até o presente momento, são conhecidos aproximadamente 3000 óleos essenciais. Destes, 300 são comerciais e representam uma importante fonte de matéria-prima para as indústrias farmacêutica, agronômica, alimentícia, sanitária, cosmética e de perfumes. Alguns ainda podem apresentar propriedades medicinais particulares, as quais foram associadas à cura de uma ou outra disfunção de órgãos ou distúrbios sistêmicos (Bakkali et al., 2008; Hajhashemi et al., 2003). Cabe ressaltar que, os óleos essenciais também são bastante conhecidos por suas propriedades antissépticas, tais como bactericida e antifúngica, além de sua utilização para outros fins medicinais como analgésicos, sedativos e espasmolíticos, por exemplo. Mais recentemente, os OEs vêm ganhando espaço na indústria alimentícia como conservantes para preservar os alimentos, embora já sejam amplamente utilizados como aromatizantes. Também possuem ampla aplicabilidade nas indústrias de perfumaria e cosméticos, onde são utilizados como princípios ativos na fabricação de fragrâncias e de cosméticos em geral (Phillips et al., 2012; Bakkali et al., 2008; Kejlová et al., 2010). Em contrapartida, apesar das

características benéficas apresentadas pela maioria dos óleos essenciais, devem ser levados em consideração, os efeitos tóxicos que estas substâncias podem causar em diferentes situações, as quais podem variar de uma pequena reação alérgica de pele a severas intoxicações com efeitos convulsivos e psicotrópicos (Onofre et al., 2008).

Diversas metodologias de extração de óleos essenciais são descritas na literatura, dentre elas se destacam a destilação por arraste a vapor, a hidrodestilação, a extração com dióxido de carbono supercrítico, a prensagem a frio e a extração por solventes orgânicos voláteis, entre outros. O OE extraído pode variar em quantidade e qualidade de sua composição química, dependendo de fatores como clima, composição do solo, parte da planta, idade e estágio do ciclo vegetativo (Masotti et al., 2003; Angioni et al., 2006). Quando obtidos de diferentes partes da mesma planta (flores, folhas, brotos, sementes, galhos, cascas, ervas, madeira, frutas e raízes) podem apresentar características físico-químicas, composição química e odores bastante distintos (Poletto, 2002; Burt, 2004). Na maioria das vezes, as propriedades físicas dos OEs são muito semelhantes, embora tenham constituição química bem distinta. São pouco solúveis em água, entretanto são solúveis em solventes orgânicos de baixa polaridade (Cowan, 1999; Bakkali et al., 2008).

Os OEs podem ser constituídos por 20 a 60 componentes diferentes em concentrações distintas. Na maioria das vezes, estas misturas são caracterizadas por apresentar dois ou três constituintes majoritários, cujas concentrações oscilam entre 20 a 70% em comparação aos demais componentes presentes na amostra (Bakkali et al., 2008).

Na composição química dos óleos essenciais, destacam-se dois grupos biossintéticos distintos. O grupo mais representativo é constituído por terpenos e terpenóides e o outro grupo engloba compostos aromáticos e alifáticos, todos caracterizados por apresentar baixo peso molecular (Pichersky et al., 2006). Os terpenos são compostos constituídos por carbono e hidrogênio e quando apresentam oxigênio em sua estrutura são também conhecidos como terpenóides (Rodrigues et al., 2008). A Figura 2 ilustra alguns representantes destas classes.

Os terpenóides de origem vegetal desempenham funções importantes relacionadas ao mecanismo de defesa das plantas, uma vez que estes atuam como

inseticidas, como agentes de atração polínica, agentes de defesa contra herbívoros, feromônios, hormônios vegetais e moléculas de sinalização (Robbers et al., 1997).

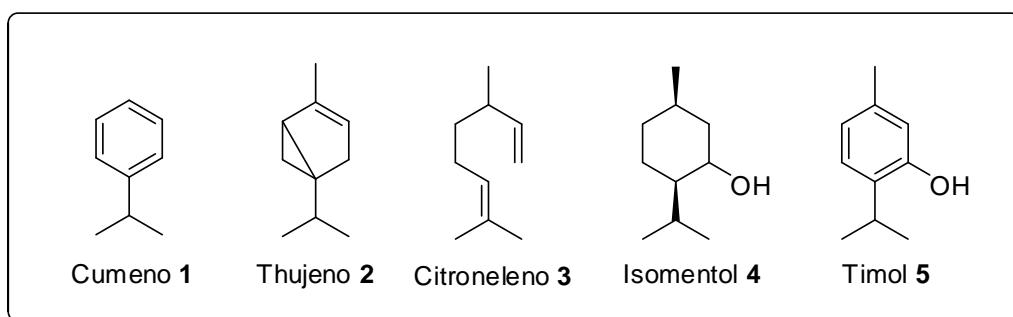


Figura 2. Compostos terpênicos e terpenóides.

As unidades de isopreno, que constituem os terpenos, são formadas biogeneticamente a partir do Acetil-CoA na via do ácido mevalônico que, ao sofrer fosforilação e descarboxilação, origina o isopentenilpirofosfato (isopentenil-PP) que se isomeriza à dimetilalilpirofosfato (dimetilalil-PP), conforme Figura 3. Nesse sentido, a condensação desses isômeros, seguida de posteriores incorporações de unidades de isopentenil-PP, leva a formação de todos compostos terpenóides (Robbers et al., 1997; Simões et al., 2002).

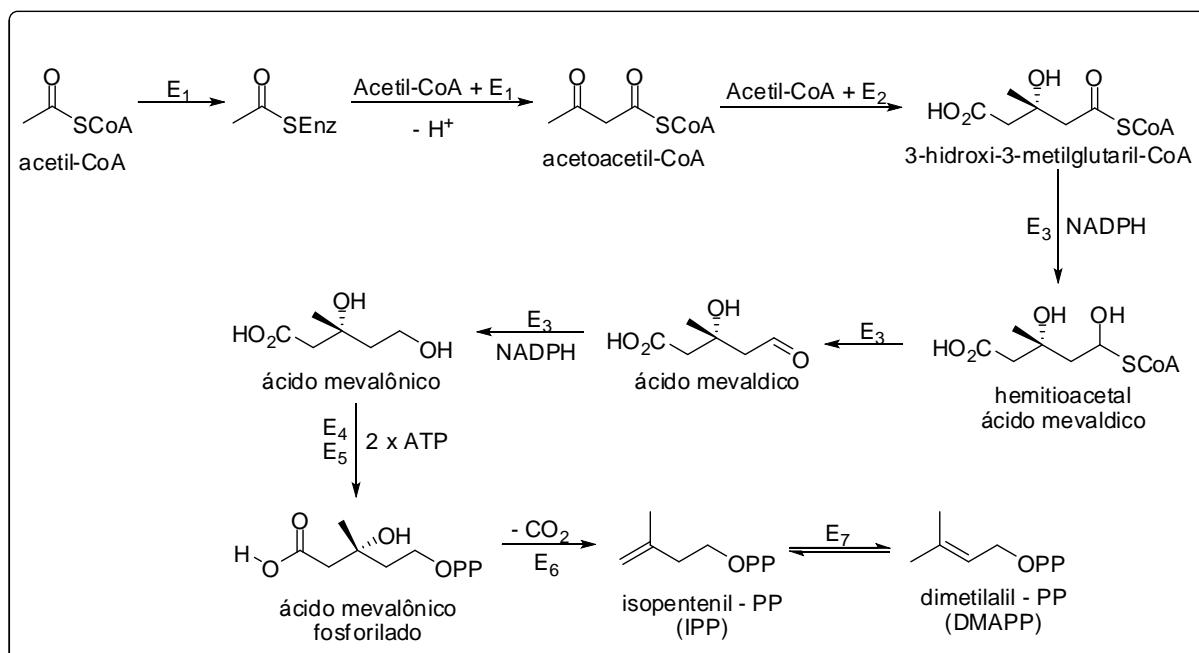


Figura 3. Precursors dos terpenóides. E₁ – acetoacetyl-CoA sintase, E₂ – 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintase, E₃ - 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase, E₄ – mevalonato quinase, E₅ – fosfomevalonato quinase, E₆ – mevalonato 5-difosfato decarboxilase, E₇ – isopentenil difosfato isomerase.

Segundo Degenhardt e colaboradores (2009) nas plantas a formação das diferentes unidades terpênicas pode ser atribuída a uma classe de enzimas conhecidas como terpeno sintase. Assim, as principais causas da multiplicidade de compostos terpenóides encontradas, se dá em função do grande número de terpeno sintases diferentes encontradas na natureza e também pelo fato de que algumas terpno sintases podem produzir diversos produtos diferentes utilizando o mesmo substrato (Degenhardt et al., 2009).

Como diversos compostos terpênicos podem ser formados, foi elaborada uma classificação geral dessas estruturas, as quais podem ser agrupadas com relação ao número de unidades de isopreno conectadas em uma mesma estrutura. Assim, as classes de terpenóides obtidas a partir da condensação das unidades de isopreno estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Formação dos compostos terpênicos relacionados a unidades de isoprenos.

Nº Unidades	Nº átomos de C	Fórmula Molecular	Esqueleto	Nome ou Classe
1	5	C ₅ H ₈		Isopreno
2	10	C ₁₀ H ₁₆		Monoterpenos
3	15	C ₁₅ H ₂₄		Sesquiterpenos
4	20	C ₂₀ H ₃₂		Diterpenos
5	25	C ₂₅ H ₄₀		Sesterpenos
6	30	C ₃₀ H ₄₈		Triterpenos
8	40	C ₄₀ H ₆₄		Tetraterpenos
N	n	C _{5n} H _{8n}		Polisoprenos

Os compostos terpênicos mais comuns encontrados nos óleos essenciais (Apêndice A, página 93) são os monoterpenos (aproximadamente 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos, os quais por apresentarem moléculas menores, são mais voláteis podendo ser responsáveis pelos aromas presentes nessas misturas

(Robbers et al., 1997; Simões et al., 2002). Outros terpenóides como os diterpenos, podem ser encontrados em óleos voláteis extraídos com solventes orgânicos.

Os monoterpenos podem ser divididos em três subgrupos, com relação a sua estrutura, assim podem ser classificados como acíclicos (mirceno **6** e linalol **7**, por ex.), monocíclicos (α -felandreno **8**, α -cimeno **9** e α -terpineol **10**, por ex.) e bicíclicos (α -pineno **11**, canfeno **12** e sabineno **13**, por ex.). Também são encontradas nos óleos essenciais, outras unidades monoterpênicas funcionalizadas, como por exemplo, alcoóis (geraniol **14**, α -terpineol **10** e fenchol **15**), aldeídos (geranal **16** e citronelal **17**), cetonas ((*Z*)-tagetona **18**, carvona **19** e cânfora **20**), ésteres (acetato de linalol **21**), éteres (1,8-cineol **22**), peróxidos (ascaridole **23**) e fenóis (timol (**5**) e carvacrol **24**) (Bakkali et al., 2008).

Os sesquiterpenos encontrados nos óleos voláteis, também apresentam uma grande variedade de estruturas. Entretanto, os mais comuns são aqueles pertencentes às funções orgânicas alcoóis, cetonas e hidrocarbonetos. Como exemplo desta classe de compostos, podem ser citados o cariofileno **25**, α -eudesmol **26**, ledol **27**, bisabolol **28**) e óxido de cariofileno **29** (Bakkali et al., 2008; Robbers et al., 1997).

1.2.1 Óleo Essencial de *Tagetes minuta* Linn

De acordo com a literatura, pode-se observar que a composição química dos óleos essenciais extraídos da *T. minuta*, varia muito de acordo com a localização geográfica em que a planta foi coletada. Em geral, apresentam como componentes principais os compostos mostrados na Figura 4.

Segundo Chamorro e colaboradores (2008), na província de Chaco (Argentina), o óleo essencial extraído das folhas de *T. minuta* antes do período da floração, apresentava como constituinte majoritário a di-hidrotagetona **30** (42%). Entretanto, no período de inflorescência, havia um decréscimo deste constituinte na composição do óleo essencial para 30%. Entretanto, o óleo essencial das flores desta planta apresentava em sua composição majoritariamente, os compostos β -ocimeno (45%) e (*E*)-ocimenona **33** (32%).

O óleo essencial das partes aéreas de *T. minuta*, coletadas em diferentes cidades da Argentina antes do período da florescência, apresentava como

compostos majoritários, geralmente a di-hidrotagetona **30** (62%) na cidade de San Juan, e (*Z*)- β -ocimeno **31** (20%), (*Z*)-tagetona **18** (21%) e di-hidrotagetona **30** (20%) em Buenos Aires (Gil et al., 2000). Esses autores também fizeram uma avaliação das inflorescências desta planta considerando as localizações geográficas. Assim o óleo essencial das plantas coletadas na cidade de Salta, mostrou-se rico em (*E*)- β -ocimeno **32** (63%), enquanto que o óleo essencial extraído das plantas coletadas em Buenos Aires continha o (*Z*)- β -ocimeno **31** (31%) e (*E*)-ocimenona **33** (16%) como constituintes majoritários. Já as plantas obtidas em Mendoza apresentaram os compostos (*Z*)- β -ocimeno **31** (38%) e (*Z*)-tagetona **18** (11%) em maior quantidade.

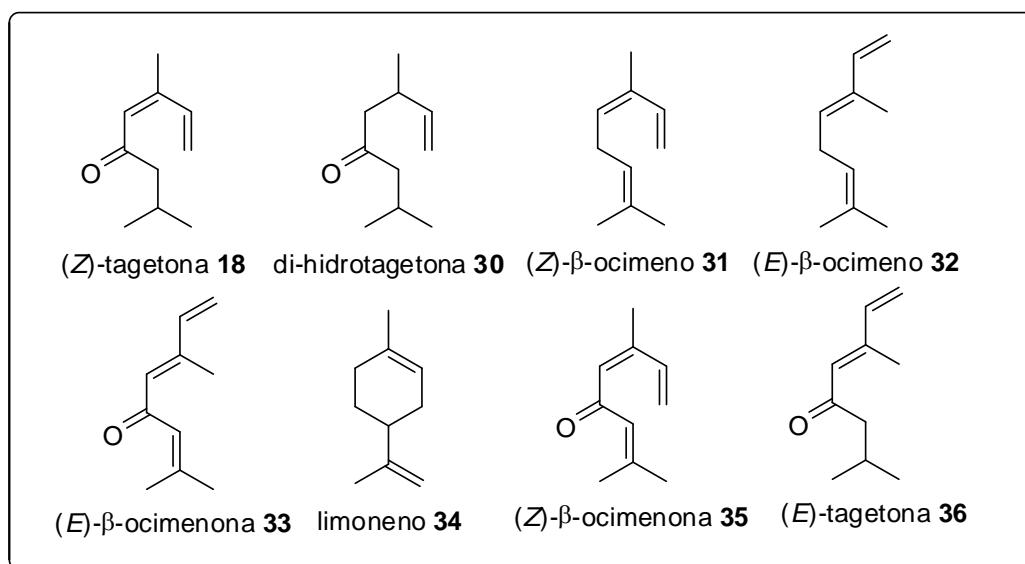


Figura 4. Estruturas dos compostos majoritários presentes no óleo essencial de *T. minuta*.

Zygadlo e colaboradores (1995) também realizaram um estudo sobre a composição química do óleo essencial das plantas de *T. minuta* coletadas na Argentina. Nesse estudo foram avaliados os componentes presentes em maior quantidade no óleo essencial extraído de toda a planta (flor, folha e caule), onde foram identificados os componentes limoneno **34** (5%), α -cimeno **9** (17%), (*Z*)-ocimenona **35** (32%) e (*E*)-ocimenona **33** (35%) em maior quantidade.

O óleo essencial das partes aéreas de *T. minuta* foi extraído de plantas coletadas em duas cidades da Índia, Nainital e Munsyary. Quando avaliados com relação a sua composição química, pode-se evidenciar uma diferença significativa

na composição dos mesmos. Os compostos (*Z*)- β -ocimeno **31** (64%) e di-hidrotagetona **30** (56%) foram identificados como constituintes majoritários dos óleos essenciais, respectivamente (Upadhyaya et al., 2010). Já de acordo com Garg & Mehta (1998), o óleo essencial das flores de *T. minuta* coletado na cidade de Kahsmir (Índia) é constituído pelos compostos (*Z*)- β -ocimeno **31** (38%) e os isômeros (*E*) e (*Z*)-ocimenona **33** e **35** (20%). Este óleo apresentou uma boa atividade larvicida nos experimentos realizados, contra o mosquito *Aedis aegypti*, evidenciando assim sua potencial aplicabilidade.

Hadjiaikhoondi e colaboradores (2008) fizeram uma avaliação da composição química do óleo essencial extraído de plantas frescas e secas coletadas no Iran. Dessa forma, os autores puderam evidenciar que a composição química dos óleos essenciais obtidos é diferente. Assim, os compostos majoritários identificados na composição química do óleo essencial das plantas frescas são (*Z*)- β -ocimeno **31** (33%) e (*Z*)-ocimenona **35** (10%). Enquanto que para as plantas secas foram (*E*)-ocimenona **33** (20%) e (*Z*)- β -ocimeno **31** (18%).

Considerando os dados apresentados na literatura observam-se diversos relatos referentes ao estudo da composição química do óleo essencial de *T. minuta*, bem como sobre o estudo das potencialidades biológicas apresentadas por estes óleos que está diretamente associada à composição química. Porém, até o presente momento, não existem relatos sobre o estudo da composição química e das propriedades biológicas destes óleos essenciais extraídos de plantas cultivadas na metade Sul do estado do Rio Grande do Sul. Existem apenas estudos sobre a composição química do óleo essencial das flores de *T. minuta* coletadas nos estados de Pernambuco (Triunfo) e da Bahia (Jacobina), ambos no Nordeste brasileiro. Os autores puderam evidenciar, de acordo com as análises realizadas, uma diferença significativa na composição química dos óleos essenciais, onde os compostos majoritários identificados foram di-hidrotagetona **30** (69,7%) e (*E*)-tagetona **36** (16,6%) para o óleo essencial coletado em Pernambuco. Para a amostra proveniente da Bahia, a di-hidrotagetona **30** (99,0%) foi identificada como componente majoritário.

1.2.2 Caracterização Química de Óleos Essenciais

A instrumentação analítica, a qual se utiliza de técnicas de separação química, tem grande importância na identificação precisa dos componentes presentes nos óleos essenciais.

Dessa forma, geralmente são empregadas diferentes técnicas de cromatografia para promover a caracterização química dos óleos essenciais, sendo esta um eficiente método de separação no qual os componentes de uma amostra são distribuídos entre duas fases, uma estacionária com uma grande superfície, e outra móvel que percola através de um leito fixo (Robbers et al., 1997).

Portanto, em um dado sistema cromatográfico, a amostra é forçada a migrar através da fase estacionária por meio de um fluxo constante da fase móvel, a qual por diferença de afinidade química origina diferença na velocidade de migração das espécies, possibilitando a separação dos constituintes químicos presentes no óleo essencial, amostra com alto grau de complexidade na maioria dos casos. A identificação dos compostos presentes em um dado óleo essencial pode ser realizada, comparando-se o tempo de retenção de um padrão com o tempo de retenção da amostra, utilizando-se um mesmo padrão de análise (Robbers et al., 1997).

Dessa forma, considerando diferentes condições de medida e as variações do tempo de retenção, introduziu-se o índice de Kovats (IK) o qual relaciona o tempo de retenção dos componentes de uma amostra ao tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos homólogos, conforme exposto na Equação 1. Esse fator possibilita a comparação entre os resultados obtidos experimentalmente em diferentes laboratórios.

$$IK = 100n + 100 \left(\frac{T_{Ri} - T_{Rn}}{T_{Rm} - T_{Rn}} \right)$$

Equação 1. Determinação do índice de Kovats.

De acordo com a Equação 1, n é o número de carbonos do hidrocarboneto de referência que elui antes do composto analisado, T_{Ri} é o tempo de retenção do componente presente na amostra, T_{Rn} é o tempo de retenção do hidrocarboneto de

referencia que elui antes do componente presente na amostra e T_{RM} é o tempo de retenção do hidrocarboneto de referência que elui depois da amostra.

Adams (1995) desenvolveu uma tabela onde são reportados os índices de Kovats para diferentes compostos voláteis, os quais variam de 900 a 1900 dependendo da volatilidade apresentada pelos compostos, permitindo assim a comparação com os componentes presentes na amostra. Entretanto, como duas substâncias podem ter o mesmo índice de Kovats, ou os mesmos podem ser muito parecidos em uma mesma coluna, é recomendável que se faça a análise em duas colunas com polaridades distintas, buscando minimizar os erros.

Entretanto, para dar uma maior confiabilidade a este tipo de análise, visando uma maior segurança na identificação dos picos individuais e controlar a pureza de um pico cromatográfico, pode-se utilizar a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, a qual trouxe grandes avanços na caracterização química dos óleos essenciais.

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) é um método que permite a separação dos componentes presentes em uma dada amostra, além de fornecer também um espectro com fragmentações de massa para cada pico observado no cromatograma. O padrão de fragmentação obtido pode ser entendido como uma espécie de impressão digital do componente, e ainda pode ser utilizado para estabelecer comparações com informações espectrais contidas na biblioteca do equipamento, o que possibilita uma orientação sobre a elucidação estrutural do componente (Simões & Spitzer, 2002).

O acoplamento CG-MS na identificação de óleos essenciais une vantagens de ambas as técnicas, onde se pode obter ao mesmo tempo a alta resolução e a velocidade de análise da cromatografia gasosa aliada a previsão na identificação dos compostos de interesse e análises quantitativas, de acordo com a espectrometria de massas (Simões & Spitzer, 2002).

Nesse sentido, considerando as vantagens e a confiabilidade dos resultados proporcionados a partir da combinação das técnicas de cromatografia gasosa e de espectrometria de massas, ocorreu uma grande difusão da técnica, possibilitando uma ampla aceitação dos seus resultados tanto na indústria quanto na pesquisa.

1.2.3 Propriedades Biológicas Apresentadas por Óleos Essenciais

Os compostos provenientes do metabolismo das plantas, como os óleos essenciais, interessam ao homem moderno principalmente por sua potencialidade em se tornar um produto terapêutico. Muitos desses componentes quando usados em doses adequadas podem ser convertidos em medicamentos. Desse modo, produtos secundários envolvidos na defesa através de atividade citotóxica contra patógenos podem ser úteis como agentes antifúngicos e antibacterianos e os envolvidos através de atividade neurotóxica podem ter efeitos benéficos ao homem, atuando como antidepressivos, sedativos, relaxantes musculares ou anestésicos (Briskin, 2000).

Dessa forma, considerando-se as propriedades biológicas descritas na literatura (Bakkali et al., 2008; Gülçin et al., 2010; Victoria et al., 2012), as quais são conferidas aos óleos essenciais extraídos de diferentes espécies de plantas, cabe-se ressaltar que na maioria das vezes, os componentes majoritários dos óleos essenciais são os responsáveis pelos resultados obtidos a partir dos ensaios de atividade biológica (Bakkali et al., 2008), entretanto em alguns casos o efeito sinérgico existente entre todos os componentes do óleo essencial também deve ser considerado (Victoria et al., 2012).

1.2.3.1 Atividade antifúngica dos Óleos Essenciais

Os alimentos de maneira geral apresentam características próprias como cor, sabor, odor e aparência. Entretanto, microrganismos podem ocasionar mudanças nessas características, já que estes utilizam os alimentos como fonte de nutrientes para o seu crescimento e desenvolvimento. Dependendo da alteração causada, o alimento pode perder valor de mercado e ainda ocasionar riscos à saúde do consumidor, tais como intoxicações e doenças (Frazier e Westhoff, 1993).

De modo geral, infecções causadas por fungos, quando limitadas à superfície dos tecidos, são relativamente fáceis de serem curadas. Entretanto, em pacientes imunologicamente vulneráveis, como pacientes que apresentam queimaduras em grande parte do corpo, pacientes recém transplantados ou portadores de doenças imunossupressoras, as infecções provocadas por fungos podem ser graves. Nesse

sentido, o estudo de novas substâncias com capacidade antifúngica se faz necessário, para auxiliar no tratamento dessas doenças ou então substituir os fármacos existentes por outros mais eficientes, uma vez que estes organismos podem se tornar resistentes. Assim, nos últimos anos pode-se observar um estudo crescente na utilização de diversos óleos essenciais como potentes antifúngicos.

Um exemplo é o óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora* (Victoria et al., 2012) que apresentou resultados satisfatórios contra espécies do gênero *Candida*, onde os valores de MIC variaram de 93,7 a 208,3 µg/mL. Segundo estudos anteriores, a ação antifúngica apresentada por este óleo essencial se dá em função da presença dos compostos germacreno **37** e seline-1,3,7-trien-8-ona **38** em sua composição. Em outro trabalho, Freile e colaboradores (2012) publicaram um estudo referente ao óleo essencial de *Baccharis darwinii*, o qual apresentou bons resultados com relação à atividade antifúngica contra fungos da espécie *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. neoformans*) e *Sacharomyces cerevisiae*, *Microsporum gypseum* e *Trichophyton rubrum* onde a concentração inibitória mínima (MIC) observada foi de 62,5 µg/mL e de 125 µg/mL para a espécie *Trichophyton mentagrophytes*. De acordo com os autores, e com estudos anteriores, o efeito significativo apresentado por este óleo essencial esta relacionado com seu constituinte majoritário o limoneno **34** (47%), ao qual já são atribuídas propriedades antifúngicas na literatura.

O óleo essencial de *Seseli tortuosum* e de *Seseli montanum* subsp. foram avaliados com relação a sua composição química, atividade antifúngica e citotoxicidade. Nesse sentido, de acordo com os autores os constituintes majoritários presentes no óleo essencial de ambas as espécies foram α-pineno **11**, β-pineno **39** e (Z)-β-ocimeno **31** em diferentes proporções. Os ensaios antifúngicos realizados, avaliaram a ação dos dois óleos essenciais e também de seus constituintes majoritários isolados, contra diferentes espécies do gênero *Candida*, *Trichophyton*, *Cryptococcus*, *Microsporum* e *Aspergillus*, onde pode-se observar bons resultados quando comparados ao fluconazol, conhecido antifúngico de referência. Assim, a concentração inibitória mínima (MIC) observada para as duas espécies de óleos essenciais foram consideradas satisfatórias, com relação ao padrão de referência, para as diferentes espécies de fungos testadas, com exceção ao gênero *Aspergillus*. Os melhores resultados observados (MIC) foram contra as cepas *Cryptococcus neoformans* (0,64 e 1,25 µL/mL) e *Epidermophyton floccosum* (0,64 e 0,64-1,25

$\mu\text{L/mL}$) para os óleos essenciais de *Seseli tortuosum* e de *Seseli montanum* subsp. respectivamente (Salgueiro et al., 2012).

Ainda de acordo com Salgueiro e colaboradores (2012), foi possível fazer a avaliação antifúngica dos constituintes majoritários presentes no óleo essencial. Dessa forma, os autores puderam evidenciar que, provavelmente, a ação antifúngica expressada pelos óleos essenciais possa estar relacionada aos constituintes α -pineno **11** e (Z)- β -ocimeno **31**, já que ambos apresentaram atividade semelhante à expressada pelos óleos testados. Entretanto, o constituinte β -pineno **39** não apresentou bons resultados no ensaio, o que indica que este não contribui significativamente para a ação apresentada por ambas as espécies de óleos essenciais. É valido ressaltar ainda que, mesmo com esses resultados preliminares, não se pode afirmar com veemência que a ação antifúngica apresentada pelos óleos essenciais *Seseli tortuosum* e de *Seseli montanum* subsp. ocorra somente em função dos seus constituintes majoritários, uma vez que há estudos onde são reportados a eficácia dos óleos essenciais pelo mecanismo de ação sinérgica apresentada por todos seus constituintes.

1.2.3.2 Atividade antioxidante dos Óleos Essenciais

Os constituintes químicos presentes nos diferentes óleos essenciais apresentam diversas funções ecológicas de adaptação e defesa, dentre as quais se destacam ação antimicrobiana, herbicida, dispersão de pólen, anticâncer, antinociceptiva e propriedades antioxidantes (Bakkali et al., 2008).

Os compostos que apresentam atividade antioxidante possuem a capacidade de neutralizar as espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) que estão presentes ou que são produzidas em desequilíbrio nos diferentes organismos (estresse oxidativo), as quais podem causar severos danos às biomoléculas que constituem as porções celulares.

O processo de estresse oxidativo se origina a partir da existência de um desequilíbrio entre os compostos antioxidantes e oxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção dos mesmos. Tais processos conduzem a oxidações de biomoléculas, com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja

manifestação é o dano oxidativo contra células e tecidos (Halliwell et al., 1995), resultando na manifestação de algumas enfermidades crônicas não transmissíveis como aterosclerose, alguns tipos de câncer, mutações, envelhecimento, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, entre outras (Barbosa et al., 2010).

A formação de radicais livres ou espécies reativas é resultante na maioria das vezes do metabolismo do oxigênio ocorrido na cadeia transportadora de elétrons (CTE). Os sistemas de defesa antioxidantes têm como função inibir ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres. Podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos no organismo humano, onde ambos atuam de maneira conjunta com a finalidade de proteger as células (Há et al., 2006; Roberts & Sindhu, 2009).

O sistema enzimático é constituído por quatro enzimas principais, responsáveis pela neutralização das EROs ou de ERN, sendo elas a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e o sistema glutationa peroxidase (GPx) / glutationa redutase (GR). Enquanto que o sistema de defesa antioxidante não enzimático é constituído por pequenas moléculas, as quais atuam na detoxificação das espécies reativas a partir da doação de elétrons de suas estruturas aos radicais livres, sem tornarem-se também reativas em função de sua estabilidade. Dentre estas moléculas com atividade antioxidante estão, principalmente, os flavonóides, as vitaminas A, E e C e também a glutationa reduzida (GSH) (Halliwell & Gutteridge, 1990; Packer, 1997).

Portanto, de acordo com dados da literatura, nos últimos anos a pesquisa com relação às propriedades antioxidantes dos óleos essenciais, vem se intensificando. Gülçin e colaboradores (2010) avaliaram o potencial antioxidante do óleo essencial de cravo a partir de diferentes ensaios *“in vitro”*. O óleo essencial foi obtido a partir da hidrodestilação das flores, folhas e caules da planta. Assim, em um ensaio para avaliar os níveis de inibição da peroxidação lipídica, o óleo essencial de cravo apresentou excelentes resultados, dentre os quais a inibição da oxidação em 97,3% quando utilizada uma amostra com concentração de 15 µg/mL, resultado este superior ao butilidroxianisol (BHA) utilizado como um antioxidante de referência. O mesmo óleo essencial também apresentou bons resultados em outros ensaios, como atividade neutralizante de peróxido de hidrogênio, atividade quelante do íon

ferroso, neutralização do radical superóxido e neutralização dos radicais DPPH e ABTS.

O óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora* também foi avaliado com relação ao seu potencial antioxidant (Victoria et al., 2012). Nesse sentido foram realizados alguns experimentos “*in vitro*” onde se pode verificar um IC_{50} de $833,3 \pm 20,7$ $\mu\text{g/mL}$ no ensaio de neutralização do radical DPPH. Já em outro ensaio realizado, onde foi verificada a capacidade de neutralização dos radicais cátions de ABTS, o IC_{50} observado foi de $8,1 \pm 0,20$ $\mu\text{g/mL}$ o que sugere que o mecanismo de ação antioxidant apresentado pelo óleo essencial está baseado principalmente no método da transferência de elétrons. Outros ensaios também foram realizados, para avaliar a toxicidade e as interações estabelecidas entre o óleo essencial e as enzimas δ -Ala-D e catalase, onde se observou, a partir de experimentos realizados com camundongos, que a amostra não interferiu na ação destas enzimas.

Outro trabalho descrito com o mesmo enfoque é a avaliação da capacidade antioxidant, anticâncer e antimicrobiana do óleo essencial de *Lycopus lucidus*, o qual apresentou atividade antioxidant moderada nos ensaios de neutralização dos radicais DPPH e hidroxil com IC_{50} de 0,95 e 1,21 mg/mL , respectivamente (Yu et al., 2011). O óleo essencial e o extrato obtido de *Rhizoma Homalomenae* também foram avaliados com relação a sua capacidade antioxidant. Nesse sentido, a partir dos experimentos realizados pode-se perceber que o extrato da planta apresenta uma capacidade antioxidant superior a apresentada pelo óleo essencial. Porem, os resultados obtidos nos experimentos “*in vitro*” de neutralização dos radicais DPPH e ABTS com a utilização do óleo essencial mostraram resultados satisfatórios, apresentando um IC_{50} de 120 e 11,5 mg/mL nos ensaios, respectivamente.

1.2.3.3 Propriedades Biológicas Apresentadas Pela Planta *T. minuta* L

De acordo com dados reportados na literatura, diferentes propriedades biológicas são atribuídas à planta *T. minuta*, dentre as quais se destacam ação herbicida, potencial alelopático, ação nematicida, antimicrobiana, acaricida, entre outras (Zygadlo et al, 2003; Singh et al, 2007; Bevilaqua et al, 2012).

A medicina popular também atribui algumas propriedades terapêuticas a esta planta, onde é recomendada sua utilização para tratar reumatismo, dispepsia, dores

intestinais, bronquites, tosses, resfriados, estimular o fluxo menstrual, entre outras aplicações (Lorenzi et al., 2008).

De acordo com Singh e colaboradores (2007), o pó das folhas secas de *T. minuta* pode ser utilizado como um potente herbicida natural. Segundo os estudos realizados pelos autores, onde foram utilizadas diferentes partes da planta (folhas, caule e raízes), as amostras foram secas e posteriormente diluídas em água, na proporção de 1, 2 ou 4g de amostra para 100 mL de água destilada, para facilitar o processo de aplicação no campo experimental de cultura de arroz. Assim foram avaliados os resultados referentes à inibição da germinação contra duas espécies de plantas invasoras comuns a esse tipo de cultura (*Echinochloa crus-galli* e *Cyperus rotundus*), assim como o comprimento da raiz e da plântula destas espécies.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que para as diferentes partes da planta utilizada, folhas, caule e raízes, os melhores resultados são aqueles em que foram utilizados 4g de amostra para 100 mL de água destilada. Entretanto, os extratos preparados com as folhas de *T. minuta* são os que apresentaram melhor desempenho para todos os aspectos analisados, seguido dos extratos do caule e das raízes respectivamente. Considerando as espécies de plantas invasoras, pode-se mencionar ainda que a espécie *Cyperus rotundus* mostrou-se mais sensível ao efeito dos extratos testados, quando comparada a espécie *Echinochloa crus-galli* (Singh et al., 2007).

Outros trabalhos foram realizados utilizando extratos aquosos (Ranilla et al., 2010) e também metanólicos (Katerere et al., 2012) das partes aéreas de *T. minuta*. Nestes trabalhos foi avaliada a capacidade antioxidante dos extratos obtidos, onde os resultados evidenciaram uma significativa atividade antioxidante nos ensaios realizados, estando esta relacionada aos componentes fenólicos presentes nesses extratos.

A capacidade nematicida das partes aéreas de *T. minuta*, foi avaliada por Macedo e colaboradores (2012) em ensaios nos quais se utilizavam de decocções da planta frente a ovos e larvas de nematóides da espécie *Haemonchus contortus*. As decocções foram preparadas utilizando a proporção de 1g de amostra para 10 mL de água destilada. Esta mistura foi fervida durante duas horas sob-refluxo com restituição do volume evaporado ao final do processo. Em seguida, as amostras do decocto da planta foram utilizadas em ensaios específicos, em diferentes

concentrações, nas quais os resultados obtidos mostraram-se bastante promissores. Assim, quando utilizada uma concentração de 2,5 mg/mL da amostra ocorreu uma inibição de 96,8% da eclosão de ovos. Já considerando seu efeito inibitório contra larvas da espécie *Haemonchus contortus*, foi observado um EC₅₀ de 0,66 mg/mL, sendo esta a concentração na qual se observa 50% do efeito máximo de um composto. Dessa forma, pode-se concluir a partir dos resultados apresentados, que o decocto de *T. minuta* pode ser um potente nematicida, porém ainda se faz necessário o desenvolvimento de novos estudos.

Considerando-se as informações descritas na literatura, podem ser evidenciadas diversas propriedades biológicas atribuídas aos óleos essenciais extraídos de *T. minuta*. Nesse sentido, um exemplo é o potencial alelopático apresentado pelo óleo essencial extraído das partes aéreas de *T. minuta* frente ao crescimento das raízes de mudas de plantas da espécie *Zea mays*. Neste estudo, o óleo essencial foi extraído das partes aéreas da planta em seu período de florescência, apresentando o limoneno **34** (66%) e os isômeros (*Z*) e (*E*) do β -ocimeno **31** e **32** (21%) como seus constituintes majoritários. As mudas de plantas da espécie *Zea mays* foram tratadas com o óleo essencial de *T. minuta* e seu efeito alelopático foi avaliado depois de 24, 48 e 96 horas de tratamento. Após o período de experimentação as plantas (*Zea mays*) foram colhidas e as raízes foram dissecadas e medidas, onde foi observada a diminuição do tamanho das raízes da planta analisada, com relação ao controle (espécie não submetida ao tratamento), indicando uma provável fitotoxicidade do óleo essencial frente a espécie testada (Zygadlo et al., 2003).

Segundo Nchu e colaboradores (2012), o óleo essencial de *T. minuta* também apresenta ação repelente contra carapatos da espécie *Hyalomma rufipes*. Para o desenvolvimento deste trabalho, foi utilizado o óleo essencial extraído de uma combinação de flores, folhas e caules frescos da planta, o qual foi extraído por hidrodestilação. Segundo análise de CG-MS, os constituintes majoritários identificados no óleo essencial foram (*Z*)- β -ocimeno **31** (28%), (*E*)- β -ocimeno **32** (16%) e 3-metil-2-(2-metil-2-butenil)-furano **40** (11%). De acordo com os resultados apresentados pelos autores, não houve diferença na ação do óleo essencial frente os carapatos machos e fêmeas, onde ambos apresentaram ação repelente em uma concentração de 0,07 mL/mL. Assim, de acordo com os resultados obtidos, o óleo

essencial de *T. minuta* também pode ser considerado como um promissor agente anti-carrapatos.

Estudos realizados com o óleo essencial das flores de *T. minuta*, apontaram resultados significativos da amostra como um potente larvicida frente a larvas do mosquito *Aedes aegypti*, onde os constituintes majoritários eram (*Z*)-β-ocimeno **31** (39%) e os isômeros (*E*) e (*Z*)-ocimenona **33** e **35** (20%) para o óleo essencial extraído em Kahsmir (Índia), e di-hidrotagetona **30** (69 – 99%) para os óleos essenciais extraídos no nordeste brasileiro (Garg & Mehta, 1998; Craveiro et al., 1988).

Zygadlo e colaboradores (1995) avaliaram a capacidade antioxidante do óleo essencial extraído da planta completa de *T. minuta*, onde os autores puderam evidenciar a partir de seus resultados, os compostos (*E*) e (*Z*)-ocimenona **33** e **35** (67%) como componentes majoritários. Para verificar a eficácia da capacidade antioxidante do óleo essencial testado, foi realizado um experimento onde foi adicionado o óleo essencial de *T. minuta* a uma amostra de óleo de soja, submetendo-se o sistema a um aquecimento de 60 °C para que se possa verificar a inibição da oxidação, caso o óleo essencial possua capacidade antioxidante. Dessa forma, ao final do experimento, pode-se concluir que o óleo essencial de *T. minuta* não protegeu a amostra da peroxidação lipídica, e nesse caso o óleo essencial atuou como uma substância com caráter pró-oxidante.

Entretanto, Upadhyaya e colaboradores (2010) avaliaram o óleo essencial extraído das partes aéreas de *T. minuta* com relação a sua capacidade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana. Nesse caso, os constituintes majoritários identificados no óleo essencial foram (*Z*)-β-ocimeno **31** (64%) e di-hidrotagetona **30** (56%), para as amostras coletadas em Nainital e em Munsyari, respectivamente. Os resultados obtidos a partir de experimentos “*in vitro*” evidenciaram uma moderada capacidade antioxidante para o óleo essencial coletado em Nainital, o qual apresentou 48,53% de inibição do radical DPPH, quando utilizada uma alíquota da amostra com concentração de 100 µg/mL. No entanto, o óleo essencial não apresentou atividade anti-inflamatória. Já quando avaliado com relação a sua ação antimicrobiana, os resultados foram bastante promissores, uma vez que o óleo essencial se mostrou ativo contra bactéria do gênero Gram positivo (+) e também

Gram negativo (-), além de apresentar bons resultados contra cepas de fungos da espécie *Cândida albicas* e *Aspergillus Níger*.

Capítulo 2

Apresentação e Discussão dos Resultados

2. Resultados e discussões

Neste capítulo serão expostos os resultados obtidos a partir dos experimentos realizados no Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL) e no Laboratório do Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia ambos da Universidade Federal de Pelotas, utilizando-se como amostra os óleos essenciais das flores e folhas de *Tagetes minuta* L.

2.1 Coleta do Material Vegetal

Foram coletados aproximadamente 2 kg de material vegetal da planta *T. minuta* na Estação Experimental Cascata, localizada em Pelotas/RS na Região Sul do Brasil (latitude 31°37' S e longitude 52°31' O), situada a uma altitude de 180 m nos meses de abril e maio de 2012 por volta das 9 h da manhã. Posteriormente, o material foi separado em flores, folhas e caules e cortados em pequenos pedaços de aproximadamente 2 cm. Em seguida, secaram-se as amostras por sete dias à temperatura ambiente e com umidade controlada, procedendo-se a extração do óleo essencial na sequência.

2.2 Extração dos óleos essenciais

Foram extraídos o óleo essencial das flores, folhas e caules secos de *T. minuta*, utilizando-se 200 g de material vegetal, a partir da técnica de destilação por arraste a vapor por um período de quatro horas em triplicata. Após esse procedimento, obteve-se então o óleo essencial das flores e folhas de *T. minuta*, os quais apresentaram uma coloração amarela, com um aspecto translúcido e com odor característico das partes da planta utilizadas para a extração. Na extração do óleo essencial do caule, pode-se observar ao final do procedimento experimental, que não havia óleo essencial aparente, em função disso considerou-se que a quantidade de óleo essencial presente no caule da planta, durante o período de coleta, era quase nula não sendo possível realizar sua quantificação.

O rendimento obtido a partir da técnica de destilação por arraste a vapor para os óleos essenciais das flores e folhas de *T. minuta* foi de 2,09% (m/m) e 0,33%

(m/m), respectivamente. Os constituintes químicos presentes em ambos os óleos essenciais foram analisados e quantificados por CG-MS, seguido por determinação do índice de Kovats (IK) e pela análise no infravermelho.

2.3 Caracterização Química dos Óleos Essenciais de *Tagetes minuta* L.

2.3.1 Óleo Essencial das Flores de *T. minuta*

A identificação dos componentes do OE extraído das flores da *T. minuta* foi realizada através da comparação dos seus espectros de massas com os armazenados na biblioteca NIST/EPA/NIH presente no software do equipamento e também através da comparação dos índices de retenção de Kovats (KI) encontrados na literatura (Adams, 1995) (Tabela 2). A análise por CG-MS do óleo essencial das flores da *T. minuta* permitiu a identificação de 11 constituintes majoritários, os quais eluíram entre 7,79 e 25,15 min, representando 98,75% do óleo essencial (Figura 5).

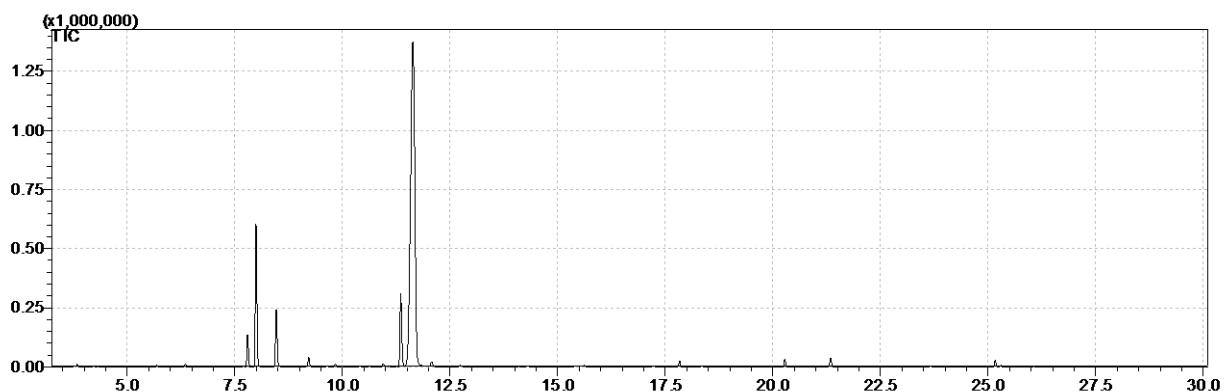
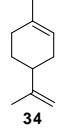
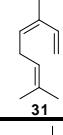
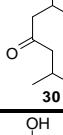
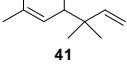
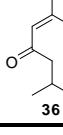
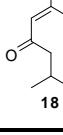
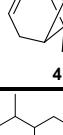
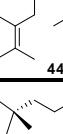
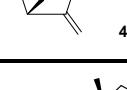
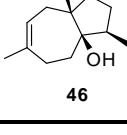


Figura 5. (a) Cromatograma do óleo essencial das flores de *T. minuta* coletada em abril de 2012, obtido via CG-MS.

Tabela 2. Composição química do óleo essencial obtido a partir da destilação por arraste a vapor das flores de *T. minuta*.

Linha	Composto	TR ^a	Conc.(%) ^b	IK _(exp.) ^c	IK _(teor.) ^d	PM ^e	Estrutura
1	limoneno	7,795	2,49	1031	1031	136	
2	(<i>Z</i>)- β -ocimeno	7,991	11,18	1038	1040	136	
3	di-hidrotagetona	8,459	4,72	1054	1054	154	
4	álcool artemisia	9,213	0,70	1080	1083	154	
5	(<i>E</i>)-tagetona	11,353	6,24	1149	1146	152	
6	(<i>Z</i>)-tagetona	11,634	70,64	1158	1153	152	
7	nonanol	12,066	0,45	1171	1171	144	
8	α -longipineno	17,829	0,45	1349	1351	204	
9	α -farneseno	20,274	0,60	1502	1508	204	
10	β -santaleno	21,338	0,78	1461	1462	204	
11	carotol	25,158	0,50	1590	1594	222	
Total		98,75					

^aTempo de retenção; ^bConcentração calculada em relação à área; ^cÍndice de Kovats experimental; ^dÍndice de Kovats teórico; ^ePeso molecular.

Posteriormente, os tempos de retenção dos compostos foram utilizados para fazer a determinação do índice de Kovats, comparando-se os resultados experimentais obtidos (Tabela 2) com dados presentes na literatura (Adams, 1995). Para isso, foram utilizados os tempos de retenção dos constituintes químicos presentes no óleo essencial, sendo estes comparados a uma série de hidrocarbonetos homóloga, padrão de alcanos C₈ – C₂₀ (Tabela 2).

Com base na análise por CG-MS (Tabela 3) e do cálculo do índice de Kovats do óleo essencial das flores, concluiu-se que os constituintes majoritários presentes neste óleo são (*Z*)-tagetona **18**, (*Z*)-β-ocimeno **31**, (*E*)-tagetona **36**, di-hidrotagetona **30** e limoneno **34**, com concentrações relativas de 70,64, 11,18, 6,24, 4,72 e 2,49% (Tabela 2).

Analizando a fragmentação do componente majoritário do óleo essencial das flores de *T. minuta*, (*Z*)-tagetona **18** (Tabela 3, linha 6 e Figura 6) pode-se evidenciar o íon molecular M⁺ de 152, com intensidade de 15,04%. Uma sugestão para o possível mecanismo de fragmentação do composto (*Z*)-tagetona, esta representado na Figura 7, onde pela perda do grupo metila, tem-se o fragmento de m/z 137 com intensidade de 8,02%, e pela perda de um grupo CH₂=CH₂, tem-se o fragmento m/z 109 com intensidade de 35,20%. Observam-se também os fragmentos m/z 95, que é o pico base com intensidade de 100% e m/z 67, com intensidade de 70,12%, evidenciando a fragmentação da cadeia carbônica e a eliminação de um grupo carbonila, respectivamente.

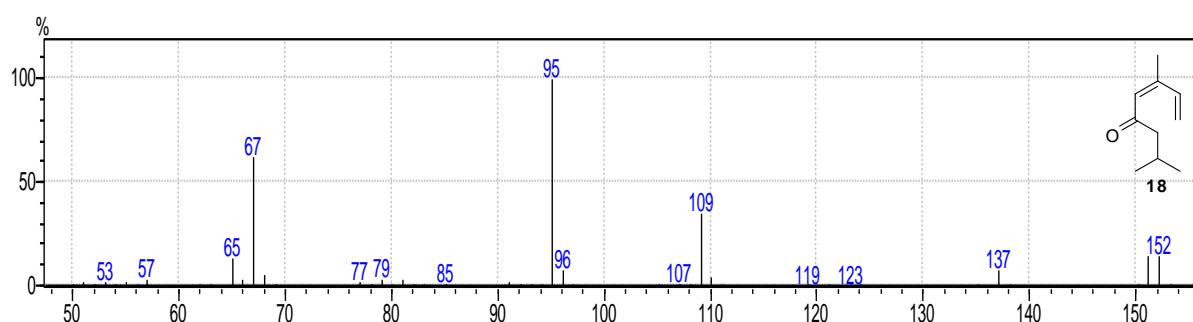


Figura 6. Espectro de massas do composto (*Z*)-tagetona **18**.

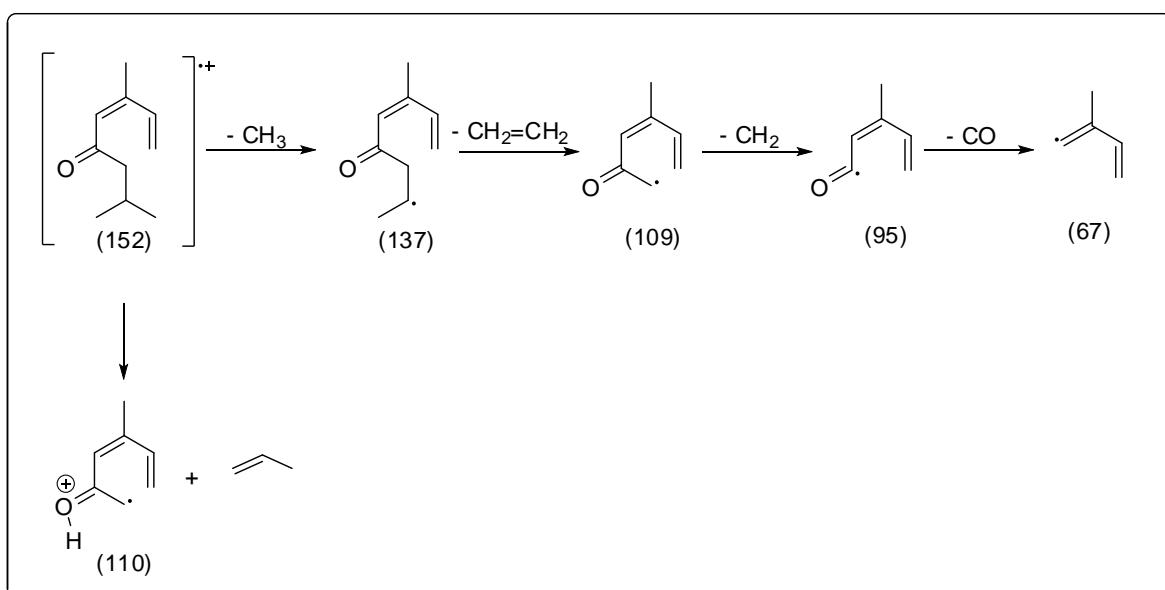


Figura 7: Possível mecanismo de fragmentação do composto (Z) -tagetona.

Considerando o segundo composto presente em maior quantidade, o (Z) - β -ocimeno **31**, na análise do seu espectro de massas (Tabela 3, linha 2 e Figura 8) pode-se verificar o íon molecular M^+ de 136, com intensidade de 0,40%. Pela perda de um grupo metila, tem-se o fragmento m/z 121 com intensidade de 9,15%, e pela perda de um grupo etila tem-se o fragmento m/z 93 com intensidade de 100%, sendo este o pico base. Observam-se também os fragmentos m/z 79 com intensidade de 38,52%, m/z 67, com 11,39% e m/z 53, com 11,65% mostrando a fragmentação da cadeia carbônica, sendo estes fragmentos constituídos pela liberação de metilas, respectivamente.

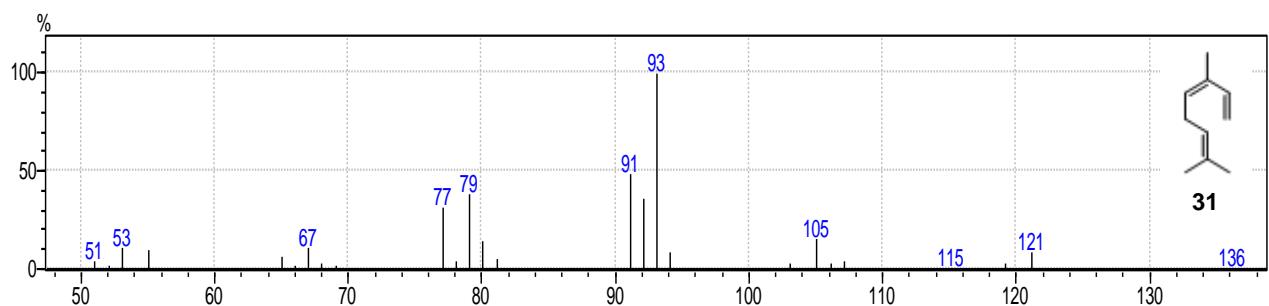
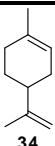
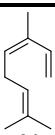
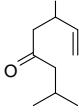
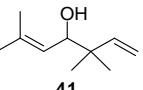
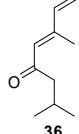
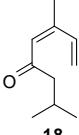
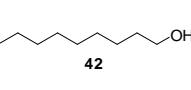
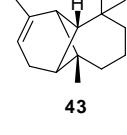
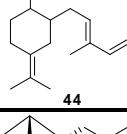
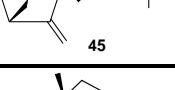
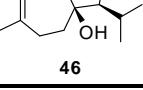


Figura 8. Espectro de massas do composto (Z) - β -ocimeno **31**.

Tabela 3. Dados do espectro de massas de baixa resolução dos compostos presentes no óleo essencial das flores de *T. minuta*.

Linha	Composto	Espectro de massas (m/z)
1		136 (M ⁺ , 12,97), 68 (100,0), 53 (20,27), 67 (83,99), 77 (17,62), 79 (35,31), 79 (35,31), 80 (12,03), 91 (22,20), 93 (68,41), 107 (20,57), 121 (19,75).
2		136 (M ⁺ , 0,40), 53 (11,65), 67 (11,39), 77 (32,17), 79 (38,32), 91 (49,04), 93 (100,0), 105 (15,72), 121 (9,15).
3		41 (100,0), 53 (5,38), 55 (41,39), 57 (80,20), 69 (60,10), 83 (4,06), 85 (62,40), 97 (18,33), 139 (1,15).
4		41 (80,08), 55 (30,12), 67 (8,90), 85 (100,0), 95 (5,40), 137 (1,16).
5		152 (M ⁺ , 2,79), 41 (30,12), 53 (2,10), 67 (100,0), 95 (91,02), 109 (15,50), 137 (8,93).
6		152 (M ⁺ , 15,04), 41 (30,12), 51 (2,12), 65 (13,41), 67 (70,12), 68 (6,05), 81 (2,04), 95 (100,0), 109 (35,20), 137 (8,02), 151 (14,47).
7		41 (100,0), 55 (80,13), 57 (31,41), 67 (32,73), 69 (79,50), 83 (10,60), 95 (36,96), 97 (18,22).
8		204 (M ⁺ , 22,04), 41 (51,60), 55 (15,68), 67 (10,20), 79 (15,50), 91 (49,20), 105 (60,0), 119 (100,0), 133 (28,90), 147 (10,2), 161 (18,30), 189 (2,14).
9		41 (100,0), 55 (35,37), 69 (40,48), 79 (50,22), 93 (70,21), 107 (36,15), 119 (32,48), 133 (10,67), 147 (9,70), 161 (1,89).
10		55 (8,42), 67 (6,35), 79 (19,87), 80 (34,37), 94 (100,0), 105 (14,47), 122 (23,36), 133 (1,98), 147 (2,11), 189 (0,95).
11		204 (M ⁺ , 16,59), 41 (100,0), 55 (27,86), 67 (45,45), 79 (35,26), 95 (40,12), 105 (56,20), 119 (50,55), 137 (18,22), 161 (80,39), 189 (6,67).

Com base na caracterização realizada por cromatografia gasosa e espectrometria de massas, verifica-se que os componentes majoritários, os isômeros (*E*) e (*Z*)-tagetona **36** e **18**, apresentam como grupo funcional uma carbonila de

cetona α,β -insaturada. Desta forma, utilizando-se a técnica de espectroscopia de absorção no infravermelho, foi possível observar em 1680 cm^{-1} (Figura 9) a presença de uma banda de grande intensidade característica da deformação axial do grupo C=O α,β -insaturado e em 3091 cm^{-1} a banda de deformação axial da ligação C-H em carbonos sp^2 . Ainda de acordo com esta análise, em 1575 cm^{-1} , é possível verificar a presença de outra banda intensa que pode ser atribuída à deformação axial da ligação C=C de grupo vinila conjugado, que devido à conjugação encontra-se mais intensa e deslocada para uma frequência mais baixa, confirmando a presença da tagetona no OE. A presença da banda em 1700 cm^{-1} pode ser atribuída ao grupo carbonila da di-hidrotagetona **30**, presente em menor quantidade.

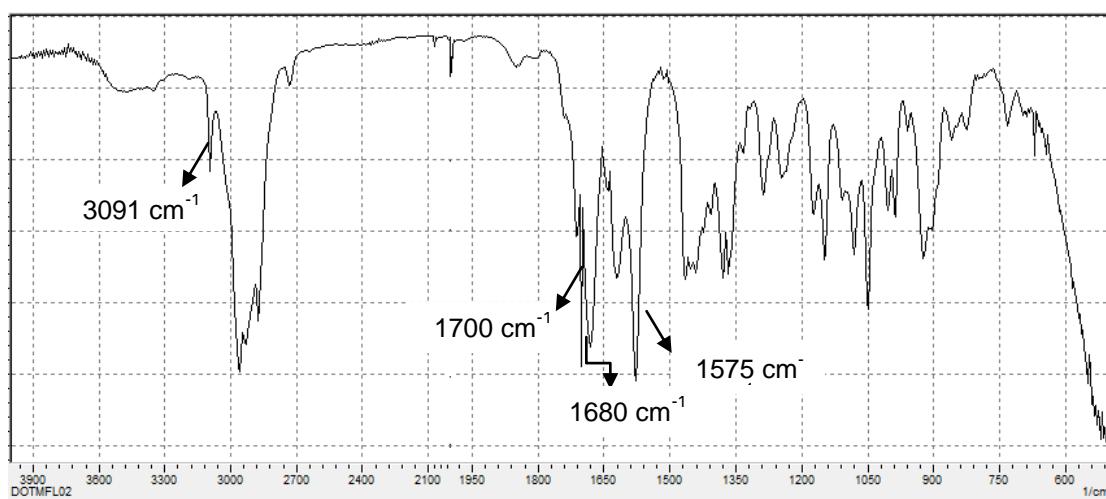


Figura 9. Espectro no infravermelho do óleo essencial das flores de *T. minuta*.

2.3.2 Óleo Essencial das Folhas de *T. minuta*

A identificação dos componentes do OE extraído das folhas da *T. minuta* foi realizada seguindo o mesmo procedimento usado para o OE das flores. Na análise por CG-MS do OE das folhas de *T. minuta*, foram identificados 9 constituintes majoritários, os quais eluíram entre 7,79 e 31,90 min de análise, representando 99,26% do óleo essencial (Figura 9).

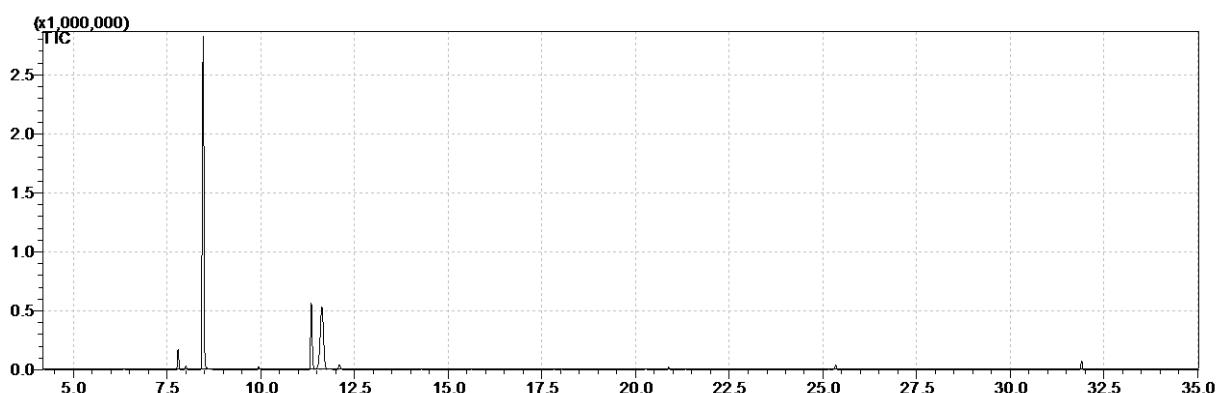
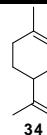
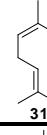
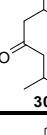
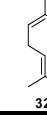
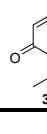
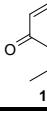
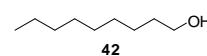
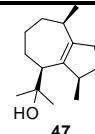
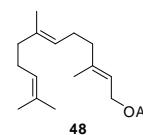


Figura 10. (a) Cromatograma do óleo essencial das folhas de *T. minuta* coletadas em abril de 2012, obtido via CG-MS. (b) Ampliação do cromatograma.

Considerando-se esta análise e os índices de Kovats (IK), pode-se observar que os constituintes majoritários presentes nessa amostra são di-hidrotagetona **30**, (*Z*)-tagetona **18**, (*E*)-tagetona **36** e limoneno **34** com concentrações relativas de 57,67, 22,86, 11,29 e 2,90%, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Composição química do óleo essencial obtido a partir da destilação por arraste a vapor das folhas de *T. minuta*.

Linha	Composto	TR ^a	Conc.(%) ^b	IK _(exp.) ^c	IK _(teor.) ^d	PM ^e	Estrutura
1	limoneno	7,792	2,90	1031	1031	136	
2	(<i>Z</i>)- β -ocimeno	7,998	0,53	1038	1040	136	
3	di-hidrotagetona	8,460	57,67	1054	1054	154	
4	(<i>E</i>)- β -ocimeno	9,941	0,55	1050	1050	136	
5	(<i>E</i>)-tagetona	11,348	11,29	1149	1146	152	
6	(<i>Z</i>)-tagetona	11,629	22,86	1158	1153	152	
7	nonanol	12,096	1,09	1172	1171	144	
8	guaiol	25,340	0,93	1596	1595	222	
9	(<i>E,E</i>)-acetato de farmesil	31,902	1,44	1837	1837	264	
Total		99,26					

^aTempo de retenção; ^bConcentração calculada em relação à área; ^cÍndice de Kovats experimental; ^dÍndice de Kovats teórico; ^ePeso molecular.

Os fragmentos extraídos dos espectros de massas dos constituintes presentes no OE das folhas de *T. minuta* encontram-se descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Dados do espectro de massas de baixa resolução dos compostos presentes no óleo essencial das folhas de *T. minuta*.

Linha	Composto	Espectro de massas (m/z)
1		136 (M^+ , 12,97), 68 (100,0), 53 (20,27), 67 (83,99), 77 (17,62), 79 (35,31), 79 (35,31), 80 (12,03), 91 (22,20), 93 (68,41), 107 (20,57), 121 (19,75).
2		136 (M^+ , 0,40), 53 (11,65), 67 (11,39), 77 (32,17), 79 (38,32), 91 (49,04), 93 (100,0), 105 (15,72), 121 (9,15).
3		154 (M^+ , 0,80), 53 (5,38), 55 (41,39), 57 (90,20), 69 (60,10), 83 (4,06), 85 (100,0), 97 (18,33), 139 (1,15), 154 (0,80).
4		136 (M^+ , 0,30), 55 (2,25), 67 (34,97), 79 (70,12), 93 (100), 121 (8,60).
5		152 (M^+ , 2,79), 53 (2,10), 67 (70,12), 95 (100,0), 109 (15,50), 124 (2,90), 137 (8,93).
6		152 (M^+ , 15,04), 41 (30,12), 51 (2,12), 65 (13,41), 67 (70,12), 68 (6,05), 81 (2,04), 95 (100,0), 109 (35,20), 137 (8,02), 151 (14,47).
7		41 (100,0), 55 (80,13), 57 (31,41), 67 (32,73), 69 (79,50), 83 (10,60), 95 (36,96), 97 (18,22).
8		59 (78,03), 67 (30,25), 79 (50,53), 91 (66,30), 105 (72,68), 119 (51,89), 133 (17,47), 161 (100,0), 189 (16,02), 204 (12,32).
9		41 (100,0), 55 (12,26), 69 (89,12), 81 (30,24), 93 (36,75), 121 (8,06), 136 (10,77), 161 (6,02), 189 (2,50).

Assim, de acordo com a fragmentação obtida do composto majoritário do óleo essencial das folhas de *T. minuta*, di-hidrotagetona **30**, pode-se evidenciar o íon molecular M^+ de 154, com intensidade de 0,80%. Uma sugestão de fragmentação para este composto pode ser evidenciado na Figura 12, onde pela perda de uma metila, tem-se o fragmento m/z 139 com intensidade de 1,15%, observam-se

também os picos m/z 97 com intensidade de 18,33%; m/z 85 que é o pico base, com intensidade de 100%, m/z 69, com 60,10% e m/z 57 com 90,20% de intensidade, evidenciando a fragmentação da cadeia carbônica.

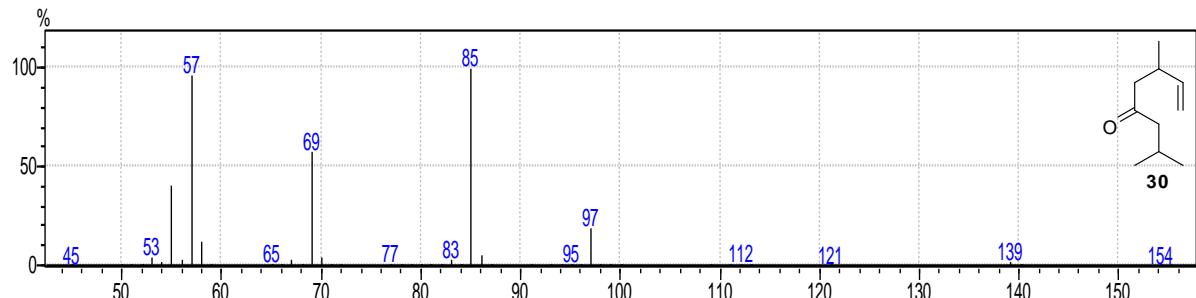


Figura 11. Espectro de massas do composto di-hidrotagetona **30**.

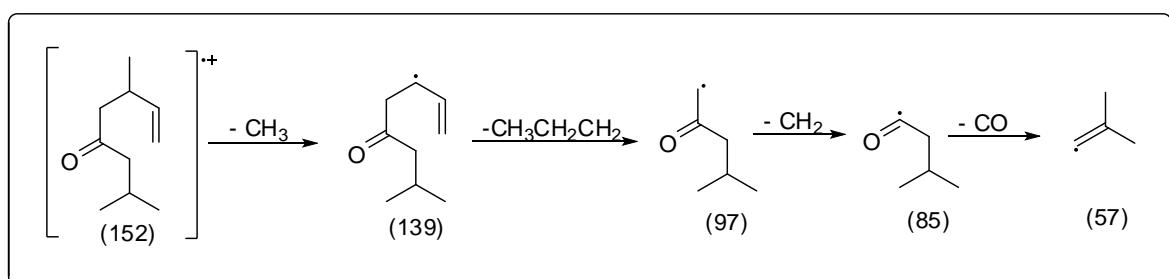


Figura 12: Provável mecanismo de fragmentação do composto di-hidrotagetona.

O segundo componente presente em maior quantidade no OE das folhas de *T. minuta* é o composto (*Z*)-tagetona **18**, principal componente do óleo essencial das flores, cuja fragmentação foi discutida no item 2.3.1, Figura 6, página 33. Na análise do espectro de massas do terceiro composto presente em maior quantidade, a (*E*)-tagetona **36** (Figura 13), pode-se observar o íon molecular M^+ 152 com intensidade de 2,79%. Uma sugestão para a fragmentação desta estrutura pode ser a formação do fragmento m/z 137 com intensidade de 8,93% pela perda de um grupo metila, evidenciam-se também os fragmentos m/z 124 com intensidade de 2,90%, m/z 109, com 15,50%, e m/z 95, pico base com intensidade de 100%, ambos caracterizados pela fragmentação da cadeia carbônica. Também se evidencia o fragmento m/z 67, com intensidade de 70,12%, caracterizado pela perda de um grupo carbonila.

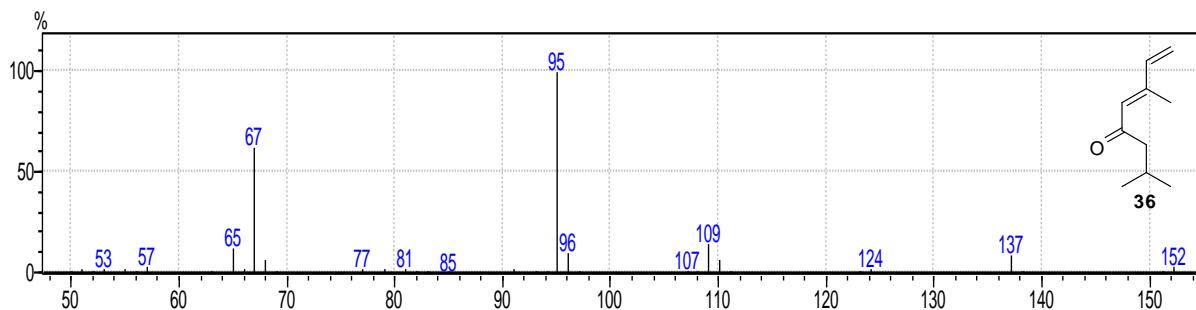


Figura 13. Espectro de massas do composto (*E*)-tagetona **36**.

O óleo essencial das folhas de *T. minuta* também foi analisado por espectroscopia de absorção no infravermelho (Figura 12). A partir do espectro obtido pode-se verificar uma banda de grande intensidade em 1700 cm^{-1} característica da deformação axial do grupo carbonila da di-hidrotagetona **30**, presente em maior quantidade. A banda em 1680 cm^{-1} refere-se à deformação axial do grupo carbonila α,β -insaturado dos compostos (*E*) e (*Z*)-tagetona **36** e **18**, presentes em menor quantidade.

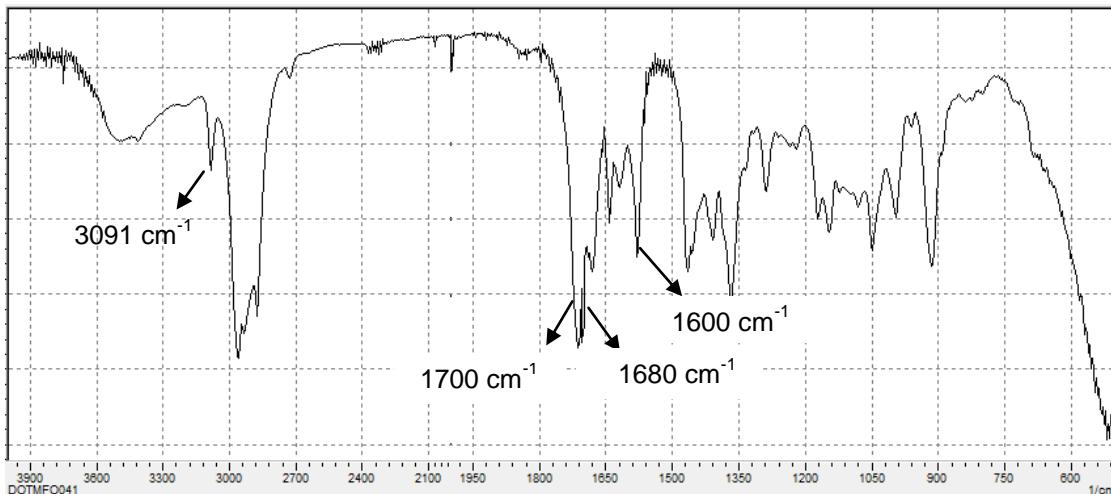


Figura 14. Espectro no infravermelho do óleo essencial das folhas de *T. minuta*.

Observa-se em 1600 cm^{-1} a banda de deformação axial da ligação C=C do grupo vinila não conjugado, confirmando a diferença na composição química deste óleo e o OE obtido das flores (Figura 9, página 36). De acordo com os espectros no infravermelho, podemos confirmar que há uma diferença significativa na composição química dos óleos essenciais das flores e folhas de *T. minuta*, e que

os resultados evidenciados nesses espectros no infravermelho são coerentes com aqueles obtidos por espectroscopia de massas e índice de Kovats.

2.3.3 Comparação Entre os Óleos Essenciais das Flores e Folhas de *T. minuta*

Os constituintes presentes no óleo essencial extraídos das flores e folhas de *T. minuta* cultivada em Pelotas são classificados como monoterpenos, sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados. A Tabela 6 mostra, de forma resumida, a composição destes OEs e dos OEs de *T. minuta* obtidos em várias partes do mundo. Assim, considerando a caracterização química realizada para os óleos essenciais das flores e das folhas de *T. minuta*, obtida de plantas cultivadas em Pelotas, verificou-se que os constituintes majoritários presentes no óleo essencial das flores são (*Z*)-tagetona **18** (70%), (*E*)- β -ocimeno **32** (11%), (*E*)-tagetona **36** (6%), di-hidrotagetona **30** (4%) e limoneno **34** (2%). Os constituintes majoritários das folhas de *T. minuta*, são di-hidrotagetona **30** (57%), (*Z*)-tagetona **18** (22%), (*E*)-tagetona **36** (11%) e limoneno **34** (2%).

Estes resultados mostram que a composição química dos óleos essenciais extraídos destas plantas coletadas na Região Sul do Brasil diferem da composição química dos óleos essenciais obtidos na Argentina (Tabela 6), descrita por Chamorro et al., 2008. O óleo essencial das flores coletadas na província de Chaco apresentou como constituintes majoritários os compostos β -ocimeno (45%) e ocimenona (34%), enquanto que o óleo essencial aqui extraído é constituído por aproximadamente 70% do composto (*Z*)-tagetona **18**. Em contrapartida, a composição química do óleo essencial das folhas de *T. minuta* é semelhante a descrita por Chamorro et al., 2008, uma vez que em ambos os casos o constituinte majoritário observado foi a di-hidrotagetona **30**.

Outros estudos realizados com plantas obtidas em diferentes cidades da Argentina apontam a di-hidrotagetona **30** e (*Z*)- β -ocimeno **31** como constituintes majoritários do óleo essencial das partes aéreas de *T. minuta*, composição esta semelhante à encontrada no óleo essencial das folhas aqui obtidas (Gil et al., 2000). Já considerando o óleo essencial das flores, pode-se observar uma diferença significativa na composição dos mesmos, uma vez que o componente (*Z*)-tagetona **18**, presente em maior quantidade no óleo essencial obtido na Região Sul do Brasil,

está presente em pequenas concentrações no óleo essencial estudado por esses autores (Gil et al., 2000), (Tabela 6).

Zygaldo et al., (1995) também fizeram uma análise da composição química do óleo essencial obtido das partes aéreas de *T. minuta* coletadas na Argentina, onde os compostos majoritários evidenciados pelos autores foram (*Z*) e (*E*)-ocimenona **36** e **33**, além de β -ocimeno, resultados diferentes dos observados na composição do óleo essencial das flores e folhas de *T. minuta* cultivada em Pelotas.

Considerando o óleo essencial das flores de *T. minuta* extraído de plantas coletadas na Índia (Garg & Mehta, 1998), pode-se observar como componentes majoritários os compostos (*Z*)- β -ocimeno **31** (39%), di-hidrotagetona (**32**) (9%), (*Z*)-tagetona (**20**) (7%) e (*Z*) e (*E*)-ocimenona (**36** e **35**) (20%) (Tabela 6), diferindo também da composição química do OE extraído das flores de *T. minuta* coletadas na região sul do Brasil. Os óleos essenciais das partes aéreas de *T. minuta*, também coletados em diferentes cidades da Índia, apresentam como componentes majoritários os compostos (*Z*)- β -ocimeno **31** (64%) e di-hidrotagetona **30** (15%) para as amostras coletadas em Nainital e di-hidrotagetona (57%), (*E*)- β -ocimeno **32** (14%) para as amostras coletadas em Munsyari, evidenciando novamente que a localização geográfica interfere na composição química dos óleos essenciais (Upadhyaya, 2010). Os resultados obtidos pelos autores na caracterização do óleo extraído em Munsyari se assemelham aos obtidos neste trabalho, quando considerada a composição química do óleo essencial das folhas de *T. minuta*, uma vez que em ambos os casos o constituinte majoritário é o di-hidrotagetona **30**.

Comparando-se os resultados obtidos em Pelotas com aqueles descritos por Craveiro et al., (1998) podemos observar que a composição química dos óleos essenciais de *T. minuta* coletada em diferentes regiões do Brasil também diferem de acordo com a região onde são cultivadas, certamente recebendo a influência do clima e do solo. Como pode ser observado na Tabela 6, o óleo essencial extraído das flores de plantas cultivadas na região nordeste do país, nas cidades de Triunfo (Pernambuco) e Jacobina (Bahia), é rico em di-hidrotagetona **30**, enquanto que o óleo essencial de plantas cultivadas em Pelotas (Região Sul) é composto majoritariamente por (*Z*)-tagetona **18** (70%). Estes autores, ainda avaliaram a composição química de um óleo essencial comercial das flores de *T. minuta*, onde

obtiveram como constituintes majoritários os compostos ocimeno (48%) e (*Z*)-ocimenona **35** (11%), diferindo também dos resultados obtidos em Pelotas.

Considerando os resultados obtidos e os dados descritos na literatura, podemos concluir que diferentes fatores, tais como condições geográficas distintas, exposição a luz solar, escassez hídrica, ventos, temperatura e possivelmente diferentes formas de extração do óleo essencial da planta, podem explicar e contribuir para esta diferença observada com relação a composição química dos óleos essenciais, já que os metabólitos secundários das plantas sintetizam os compostos necessários a sua adaptação e sobrevivência.

Tabela 6. Compostos majoritários presentes nos óleos essenciais de *T. minuta*.

Parte da planta	Origem	Compostos majoritários	Referência
Aéreas	Argentina	limoneno 34 (5%), ocimeno (17%), (<i>Z</i>)-ocimenona 35 , (<i>E</i>)-ocimenona 33 (35%)	Zygadlo et al., 1995.
Aéreas	Argentina (San Juan)	di-hidrotagetona 30 (62%)	Gil et al., 2000.
Aéreas	Argentina (Buenos Aires)	(<i>Z</i>)- β -ocimeno 31 (20%), (<i>Z</i>)-tagetona 31 (21%), di-hidrotagetona 30 (20%)	Gil et al., 2000.
Flores	Argentina (Salta)	(<i>E</i>)- β -ocimeno 32 (63%)	Gil et al., 2000.
Flores	Argentina (Buenos Aires)	(<i>Z</i>)- β -ocimeno 31 (31%), (<i>E</i>)-ocimenona 33 (16%)	Gil et al., 2000.
Flores	Argentina (Mendoza)	(<i>Z</i>)- β -ocimeno 31 (38%), (<i>Z</i>)-tagetona 31 (11%)	Gil et al., 2000.
Folhas	Argentina (Chaco)	di-hidrotagetona 30 (42%)	Chamorro et al., 2008.
Flores	Argentina (Chaco)	(<i>Z</i>) e (<i>E</i>)- β -ocimeno 31 e 32 (45%), (<i>E</i>)-ocimenona 33 (32%)	Chamorro et al., 2008.
Aéreas	Índia (Nainital)	(<i>Z</i>)- β -ocimeno 31 (64%)	Upadhyaya, 2010.
Aéreas	Índia (Munshyari)	di-hidrotagetona 30 (56%)	Upadhyaya, 2010.
Flores	Índia (Kahsmir)	(<i>Z</i>)- β -ocimeno 31 (38%), (<i>E</i>) e (<i>Z</i>)-ocimenona 33 e 35 (20%)	Garg & Mehta, 1998.
Planta fresca	Irã	(<i>Z</i>)- β -ocimeno 31 (33%), (<i>Z</i>)-ocimenona 35 (10%)	Hadjiaikhoondi et al., 2008.
Planta seca	Irã	(<i>E</i>)-ocimenona 33 (20%), (<i>Z</i>)- β -ocimeno 31 (18%)	Hadjiaikhoondi et al., 2008.
Flores	Brasil (Pernambuco)	di-hidrotagetona 30 (69%), (<i>E</i>)-tagetona 36 (16%)	Craveiro et al., 1998.
Flores	Brasil (Bahia)	di-hidrotagetona 30 (99%)	Craveiro et al., 1998.
Flores*	Brasil (Pelotas)	(<i>Z</i>)-tagetona 18 (70%), (<i>Z</i>)- β -ocimeno 31 (11%)	
Folhas*	Brasil (Pelotas)	di-hidrotagetona 30 (57%), (<i>Z</i>)-tagetona 18 (22%), (<i>E</i>)-tagetona 36 (11%)	

*Estudo realizado neste trabalho.

2.4 Isolamento dos Componentes Majoritários Presentes no Óleo Essencial das Flores e Folhas de *T. minuta*

Depois de realizada a caracterização química dos óleos essenciais das flores e folhas de *T. minuta*, os componentes majoritários foram isolados por cromatografia em coluna (CC), utilizando uma mistura de solventes hexano/acetato de etila como eluente.

2.4.1 Obtenção da (Z)-tagetona a partir do óleo essencial das flores de *T. minuta*

O óleo essencial das flores de *T. minuta* foi purificado por cromatografia em coluna, utilizando-se uma camada de sílica gel de aproximadamente 35 cm de comprimento por 3 cm de diâmetro. O componente majoritário (Z)-tagetona **18** foi removido da coluna quando se utilizou como eluente uma mistura de solventes de hexano/acetato de etila (98:2).

O produto isolado, (Z)-tagetona **18**, apresenta um odor forte e característico do óleo essencial das flores de *T. minuta*, comprovando que este é o componente responsável pelo aroma apresentado pelo óleo essencial.

A pureza do material obtido na CC foi avaliada em uma análise preliminar por cromatografia em camada delgada (CCD). Para a revelação da CCD, utilizou-se luz ultravioleta, iodo e uma solução ácida de vanilina, onde o produto é revelado com uma mancha lilás intensa. O grau de pureza (94%) foi determinado por cromatografia em fase gasosa, durante a análise por CG/MS (Figura 13).

A caracterização deste produto isolado foi realizada por CG/MS e por análise no infravermelho. O espectro de massas (Figura 15) deste composto apresenta as mesmas fragmentações observadas para a (Z)-tagetona **18** descrito na Figura 6, página 33.

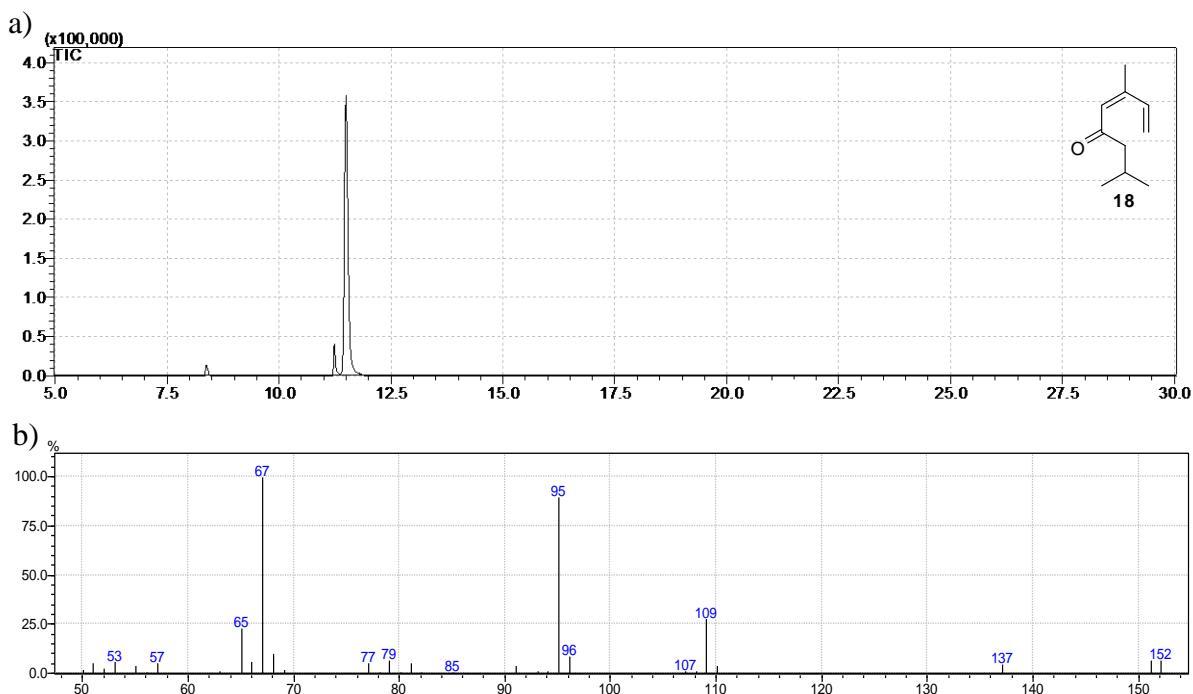


Figura 15. Cromatograma do material isolado, (*Z*)-tagetona **18**, obtido via CG-MS (a). Espectro de massas com a fragmentação do composto (*Z*)-tagetona **18** (b).

O material isolado foi submetido também a uma análise no infravermelho para verificar os grupos funcionais presentes em sua estrutura (Figura 16).

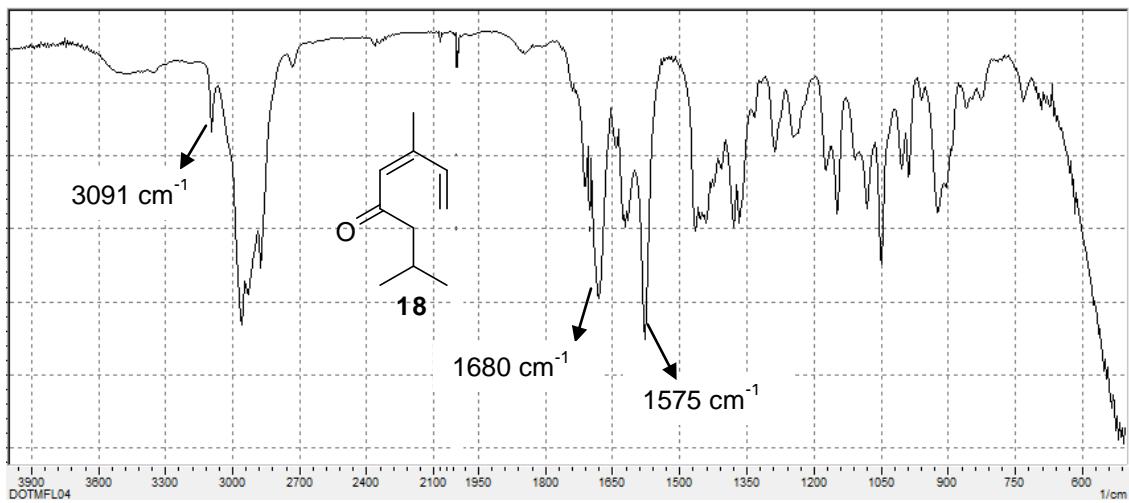


Figura 16. Espectro de infravermelho do composto (*Z*)-tagetona.

No espectro obtido no infravermelho, foi possível observar a banda característica da deformação axial do grupo carbonila α - β -insaturado, em 1680 cm^{-1}

e a diminuição na intensidade da banda em 1700 cm^{-1} , presente no espectro do OE bruto (Figura 9, página 36). Em 3091 cm^{-1} , observa-se a deformação axial da ligação C-H para carbono sp^2 e em 1575 cm^{-1} a deformação axial da ligação C=C de grupo vinílico conjugado, características do composto (*Z*)-tagetona **18**. As demais informações presentes no espectro são referentes a cadeia hidrocarbonada da substância em análise.

A análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^{13}C e ^1H) não foi obtida a tempo de colocar neste trabalho. Entretanto, estas análises serão realizadas.

2.4.2 Obtenção da di-hidrotagetona a partir do óleo essencial das folhas de *T. minuta*

O óleo essencial das folhas de *T. minuta* também foi purificado por cromatografia em coluna, utilizando-se uma coluna de sílica gel de aproximadamente 30 cm de comprimento por 3 cm de diâmetro. O componente majoritário foi removido da coluna quando se utilizou como eluente uma mistura de solventes de hexano/acetato de etila (98,5:1,5).

O produto isolado di-hidrotagetona **30** apresenta um odor forte. Entretanto, não é o responsável pelo aroma apresentado pelo óleo essencial das folhas de *T. minuta*. A pureza do material isolado foi avaliada em uma análise preliminar, por cromatografia em camada delgada, onde foi verificado que a amostra pode ser revelada em luz ultravioleta e utilizando-se uma solução ácida de vanilina, onde o produto apresenta uma mancha esverdeada intensa na parte superior da placa.

Para realizar a caracterização do produto purificado foi realizada uma análise de CG-MS, sendo que o cromatograma (figura 17) foi utilizado para determinar o grau de pureza (92%) da amostra obtida. Infelizmente, não houve quantidade suficiente de amostra para realizar a análise do produto purificado a partir das técnicas de infravermelho e de RMN de ^1H e ^{13}C . Entretanto, posteriormente essas análises serão realizadas.

Comparando-se o espectro de massas do produto isolado (Figura 17), com o espectro obtido para o óleo essencial bruto das folhas (Figura 14, página 41) pode-se observar que o composto isolado é a di-hidrotagetona **30**.

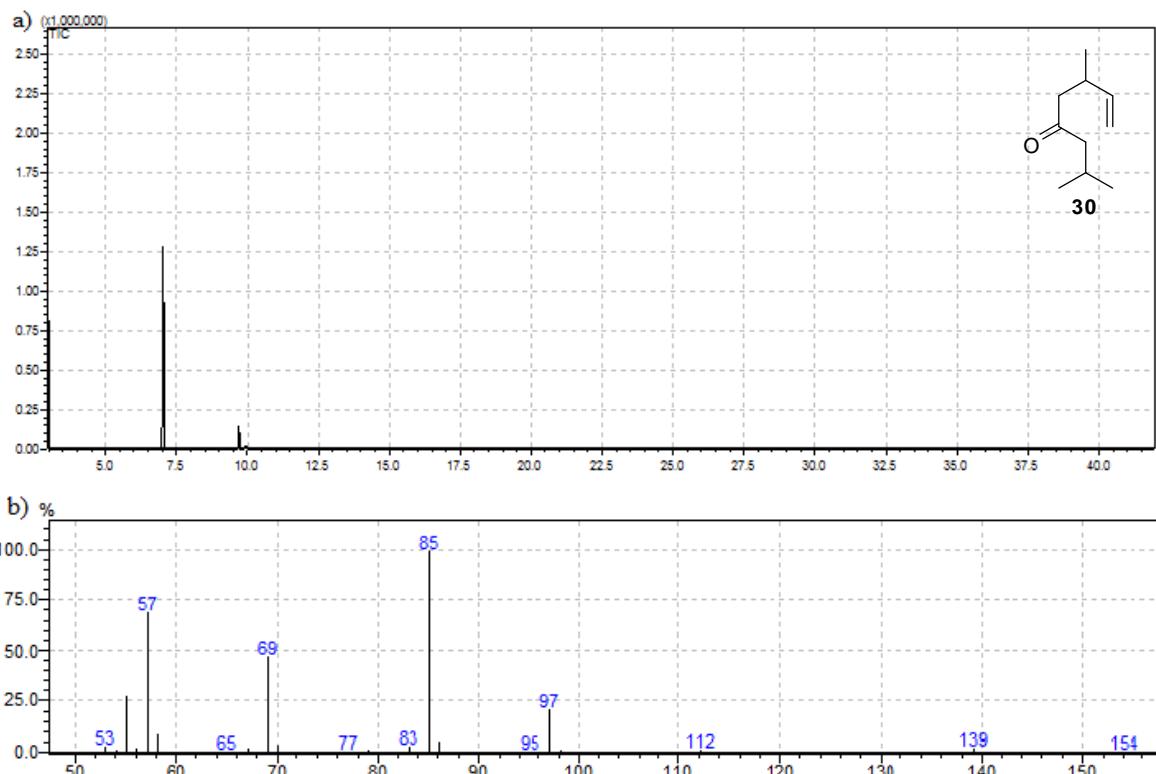


Figura 17: a) Cromatograma do material isolado (di-hidrotagetona), obtido via CG-MS. b) Espectro de massas com a fragmentação do composto di-hidrotagetona.

2.5 Determinação de parâmetros antioxidantes “*in vitro*” dos óleos essenciais das flores e folhas de *T. minuta*

Para fazer uma avaliação preliminar da capacidade antioxidante do óleo essencial das flores e folhas de *T. minuta*, realizou-se inicialmente dois testes espectrofotométricos baseados na estabilização de espécies radicalares, DPPH[•] e ABTS⁺, uma vez que ambos os testes apresentam ampla sensibilidade, são simples de serem realizados, rápidos e reproduzíveis.

A neutralização de espécies radicalares é um mecanismo de defesa antioxidante muito importante, a qual pode atuar prevenindo a degradação de alimentos e dos diferentes sistemas biológicos. Nesse sentido, diferentes métodos podem ser empregados para avaliar a capacidade antioxidante de diferentes substâncias, entretanto os ensaios químicos, onde são utilizados os radicais sintéticos, são os mais comuns (Gülçin et al., 2010).

Nesses ensaios, as amostras com possível capacidade antioxidante, são adicionadas as soluções contendo as espécies radicalares. Quando se observa um

potencial antioxidante da amostra, ocorre uma descoloração da solução metanólica de coloração violeta, no ensaio de DPPH e uma mudança de coloração na solução aquosa de azul para verde no ensaio de ABTS. Nesse sentido, qualquer alteração evidenciada nesses cromógenos permite uma avaliação rápida e eficiente da capacidade antioxidante de substâncias puras ou não isoladas.

Neste estudo, essas duas técnicas foram utilizadas para avaliar a capacidade antioxidante dos óleos essenciais extraídos de *T. minuta*. Posteriormente, outros ensaios, também foram realizados a fim de explorar a capacidade antioxidante apresentada por ambos os óleos essenciais, além de explanar a cerca de seu mecanismo de ação.

2.5.1 Ensaios sem tecido animal

2.5.1.1 Ensaio de neutralização dos radicais DPPH

O ensaio de neutralização dos radicais DPPH esta baseado, geralmente, na redução dos radicais DPPH presentes em solução metanólica a partir da doação de um átomo de hidrogênio do composto que possui capacidade antioxidante, formando uma espécie mais estável e não radicalar DPPH – H, conforme evidenciado na Figura 18 a seguir. Entretanto, o radical DPPH também pode ser estabilizado a partir da transferência de elétrons da amostra para o radical (Naik et al., 2003).

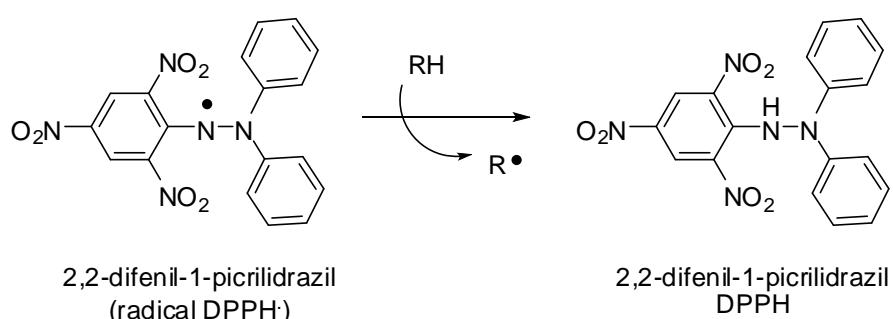


Figura 18. Reação entre DPPH[·] e o antioxidante para formar DPPH-H.

Fonte: Gülçin, 2012, p.369.

A capacidade antioxidante do óleo essencial das flores e das folhas de *T. minuta* foi avaliada em diferentes concentrações (50 – 3000 µg/mL) frente ao radical DPPH. Os resultados obtidos evidenciaram uma capacidade antioxidante para ambos os óleos essenciais testados, conforme o evidenciado na Figura 19.

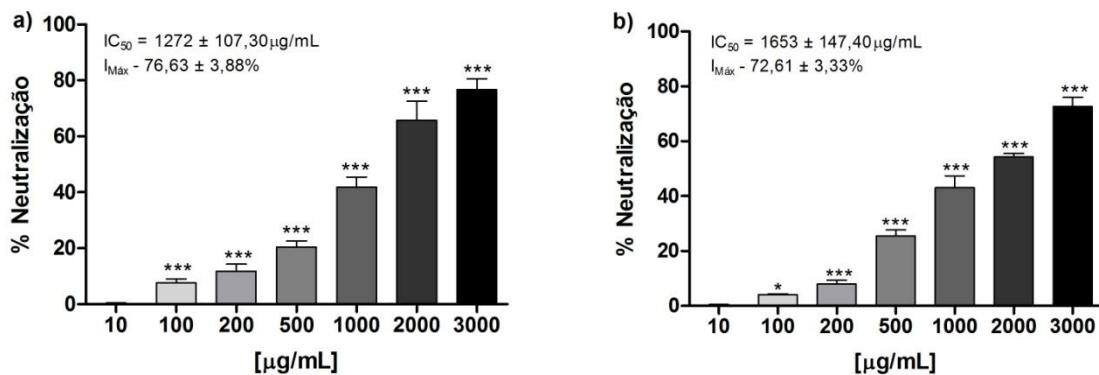


Figura 19. Efeito do óleo essencial das flores (a) e folhas (b) de *T. minuta* na capacidade de neutralização dos radicais DPPH. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão, (n=4). Os asteriscos representam efeitos significativos * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com o grupo de controle, sem óleo essencial, (one-way ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls de comparações múltiplas). IC₅₀ – concentração necessária do óleo essencial para inibir metade dos radicais livres presentes em solução. I_{Máx} – inibição máxima observada do óleo essencial no ensaio.

A partir do gráfico evidenciado na Figura 19, podemos observar que o óleo essencial das flores (a) apresentou uma maior capacidade antioxidante quando comparado ao óleo essencial das folhas (b) de *T. minuta*. Essa diferença na capacidade em neutralizar os radicais de DPPH presentes em solução pode estar associadas a diferença na composição química de ambos os óleos essenciais. Entretanto, não se pode afirmar que os constituintes majoritários sejam os responsáveis isolados pela ação antioxidante, uma vez que o efeito sinérgico de todos os constituintes do óleo essencial deve ser considerado. A concentração necessária para inibir 50% dos radicais presentes em solução, o IC₅₀ observado, foi de $1272 \pm 107,30$ e $1653 \pm 147,40$ µg/mL para flores e folhas, respectivamente. A inibição máxima observada (I_{Máx}), foi de $76,63 \pm 3,88$ e $72,61 \pm 3,33\%$ para flores e folhas, onde em ambos os casos a I_{Máx} evidenciada corresponde a concentração máxima testada, 3000 µg/mL.

De acordo com a literatura, extratos preparados com as partes aéreas de *T. minuta* já apresentaram uma boa capacidade antioxidante no ensaio de DPPH (Ranilla et al., 2010). Entretanto, o extrato aquoso utilizado para realização do experimento era rico em compostos fenólicos, os quais já possuem comprovada atividade antioxidante em razão de suas estruturas químicas (Gülçin et al., 2010).

Segundo Upadhyaya e colaboradores (2010), o óleo essencial das partes aéreas de *T. minuta* apresentou uma excelente capacidade antioxidante. Entretanto, o óleo essencial analisado era rico em (Z)-β-ocimeno, onde em uma concentração de 100 µg/mL ocorreu uma neutralização de 48,53% dos radicais sintéticos de DPPH, enquanto que na mesma concentração o óleo essencial das flores e folhas inibiu 7,58 e 4,65%, respectivamente. Cabe ressaltar ainda que o óleo essencial das flores e folhas de *T. minuta* apresentou uma boa capacidade antioxidante no ensaio de DPPH em concentrações mais elevadas.

Para tentar evidenciar qual o possível mecanismo de ação antioxidante do óleo essencial das flores e folhas de *T. minuta*, realizou-se o ensaio de neutralização dos radicais ABTS já que este possui um mecanismo de ação diferente do proposto para neutralização dos radicais de DPPH.

2.5.1.2 Ensaio de neutralização dos radicais ABTS⁺

Os radicais catiônicos sintéticos de ABTS⁺ (ácido 2,2'-azinobis-(3-etylbenzotiazolina-6-sulfônico)) podem ser utilizados para avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* de diferentes compostos naturais ou sintéticos. Entretanto, seu mecanismo de ação está associado à capacidade de transferência de elétrons do substrato para o radical cátion, visando conferir estabilidade ao mesmo (Re et al., 1999).

Assim, as amostras de óleo essencial das flores e folhas de *T. minuta* foram submetidas ao teste de neutralização dos radicais ABTS⁺ em diferentes concentrações, as quais variaram de 1 – 200 µg/mL para o óleo essencial das flores e de 10 – 3000 µg/mL para o óleo essencial das folhas, conforme pode-se observar na Figura 20.

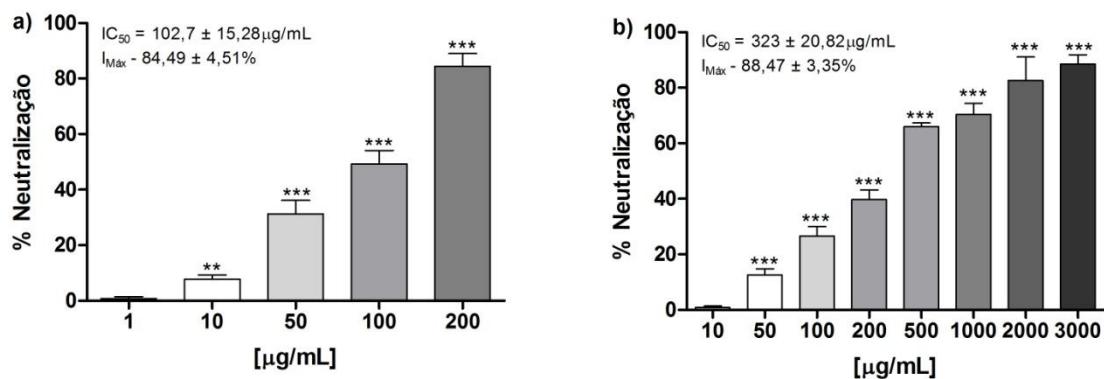


Figura 20. Efeito apresentado pelo óleo essencial das flores (a) e folhas (b) de *T. minuta* na capacidade de neutralização dos radicais ABTS⁺. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão, (n=3). Os asteriscos representam efeitos significativos * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com o grupo de controle, sem óleo essencial, (one-way ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls de comparações múltiplas). IC₅₀ – concentração necessária do óleo essencial para inibir metade dos radicais livres presentes em solução. I_{Máx} – inibição máxima observada do óleo essencial no ensaio.

A partir da Figura 20, pode-se evidenciar que a capacidade antioxidante do óleo essencial das flores de *T. minuta* foi muito superior à apresentada pelo óleo essencial das folhas. Esse fato sugere que o mecanismo de ação antioxidante do óleo essencial das flores está baseado na transferência de elétrons, já que a uma baixa concentração houve uma excelente neutralização dos radicais ABTS. Os resultados evidenciados para o óleo essencial das flores e folhas também foi superior ao observado no ensaio de neutralização dos radicais DPPH, uma vez que o IC₅₀ observado para ambos os óleos essenciais foi de $102,7 \pm 15,28$ e $323 \pm 20,82$ µg/mL, respectivamente.

Quando foram utilizadas concentrações superiores a 200 µg/mL do óleo essencial das flores no ensaio, pode-se observar a formação de uma solução turva nos tubos de ensaio. Sendo assim, apesar de ser observada uma descoloração da solução, o que é um indicativo da neutralização dos radicais ABTS⁺, os resultados obtidos foram descartados, uma vez que estes poderiam induzir ao erro.

Para tentar comprovar o mecanismo de ação antioxidante de ambos os óleos essenciais, realizou-se outro ensaio o qual busca evidenciar a capacidade de reduzir o íon férrico presente em solução, conforme os resultados apresentados abaixo.

2.5.1.3 Ensaio de neutralização dos radicais hidroxila

Os radicais hidroxila são uma das espécies radicalares mais reativas de oxigênio, os quais podem ocasionar diferentes danos a biomoléculas, dentre os quais podem se destacar a quebra de proteínas e lesões no DNA resultando no dano celular (Niki, 2010; Fan et al., 2011).

A partir do ensaio de neutralização dos radicais hidroxila, realizado com os óleos essenciais das flores e folhas de *T. minuta*, pode-se evidenciar que ambos os óleos essenciais não apresentaram a capacidade de neutralizar essas espécies reativas, onde pode-se observar a partir do experimento um aumento nos valores de absorbância da solução, conforme evidenciado na Tabela 7, o que indica que não houve efeito significativo já que quando uma amostra possui a capacidade antioxidante ocorre uma diminuição nos valores de absorbância registrados.

Tabela 7. Efeito dos óleos essenciais das flores e folhas de *T. minuta* no ensaio de neutralização dos radicais hidroxila^a.

Concentração (µg/mL)	Flores	Folhas
Controle	0,004 ± 0,002	0,004 ± 0,002
Induzido	0,691 ± 0,073	0,691 ± 0,073
10	0,687 ± 0,059	0,683 ± 0,076
50	0,702 ± 0,058	0,691 ± 0,082
100	0,759 ± 0,034	0,714 ± 0,089
200	0,784 ± 0,024	0,928 ± 0,101
500	0,739 ± 0,070	1,119 ± 0,285
1000	0,768 ± 0,078	0,837 ± 0,004
2000	0,750 ± 0,025	0,847 ± 0,091
3000	0,782 ± 0,082	0,902 ± 0,105

Os valores são expressos em média da absorbância ± desvio padrão (n=3). Os resultados foram comparados com o respectivo controle induzido, sem óleo essencial, (one way – ANOVA/Newman-Keuls).

2.5.1.4 Ensaio de neutralização do radical óxido nítrico

O radical óxido nítrico (•NO) desempenha importantes papéis em diferentes sistemas biológicos, e sua formação ocorre em função da ação da enzima óxido nítrico sintase sobre o substrato L-arginina. Entretanto, sua produção em excesso

pode desencadear um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e os sistemas de defesas antioxidantes, o que pode levar a ocasionar danos em biomoléculas como DNA e proteínas (Ramachandran et al., 2012).

A produção em excesso de radicais •NO pode também levar a formação de outro intermediário muito instável, com propriedades semelhantes ao radical •OH, o peroxinitrito (ONOO⁻) a partir da combinação do •NO com O₂^{•-}. Nesse sentido, a neutralização do radical óxido nítrico se faz muito relevante. Assim foi avaliada neste trabalho a capacidade de neutralização dessas espécies radicalares a partir de diferentes concentrações de óleo essencial das flores (1 – 3000 µg/mL) e folhas (50 – 3000 µg/mL) de *T. minuta*, onde os resultados são apresentados na Figura 21.

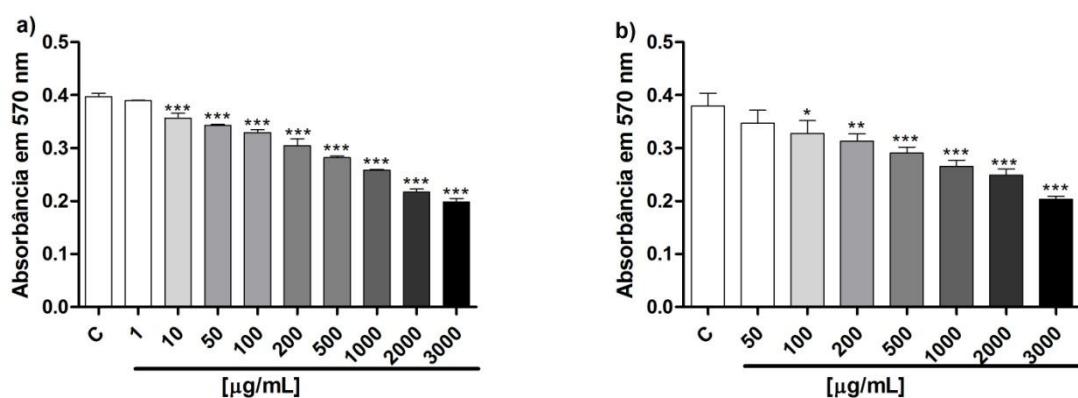


Figura 21. Efeito do óleo essencial das flores (a) e folhas (b) de *T. minuta* no ensaio de neutralização do radical óxido nítrico. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão, (n=4). Os asteriscos representam efeitos significativos * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001 quando comparados com o grupo de controle (C), sem óleo essencial, (one-way ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls de comparações múltiplas).

De acordo com os resultados expostos na Figura 21, pode-se evidenciar que a diminuição da absorbância da amostra indica a neutralização dos radicais de óxido nítrico presente em solução. Nesse sentido, podemos evidenciar uma ligeira melhora nos resultados apresentados pelo óleo essencial das flores quando comparados ao óleo essencial das folhas, uma vez que o óleo essencial das flores apresentou um resultado significativo a partir da concentração de 10 µg/mL enquanto que o óleo essencial das folhas apresentou um efeito significativo a partir de 100 µg/mL.

2.5.1.5 Ensaio de avaliação da capacidade redutora do íon férrico (Fe^{3+}) (FRAP)

Os diferentes estudos têm demonstrado que a capacidade de doar elétrons de um substrato para outro a partir de reações de oxirredução, podem estar associados à capacidade antioxidant em organismos vivos. Assim os antioxidantes podem ser explicados, nesse contexto, como espécies redutoras, na qual um substrato é reduzido em detrimento da oxidação de outro (Siddhuraju et al., 2002; Arabshahi-Delouee & Urooj, 2007; Gülçin et al., 2010).

A capacidade de doação de elétrons a partir dos componentes presentes no óleo essencial das flores e folhas de *T. minuta*, também pode ser avaliada a partir do experimento do potencial redutor do íon férrico (Fe^{3+}) (FRAP) a íon ferroso (Fe^{2+}). O ensaio FRAP está associado ao mecanismo de doação de elétrons e estima a capacidade dos antioxidantes em reduzir o complexo de ferro III (férrico tripiridiltriazina – Fe^{3+}) presente em solução ao complexo de ferro II (ferroso tripiridiltriazina – Fe^{2+}) em pH 3,6, conforme evidenciado na Figura 22.

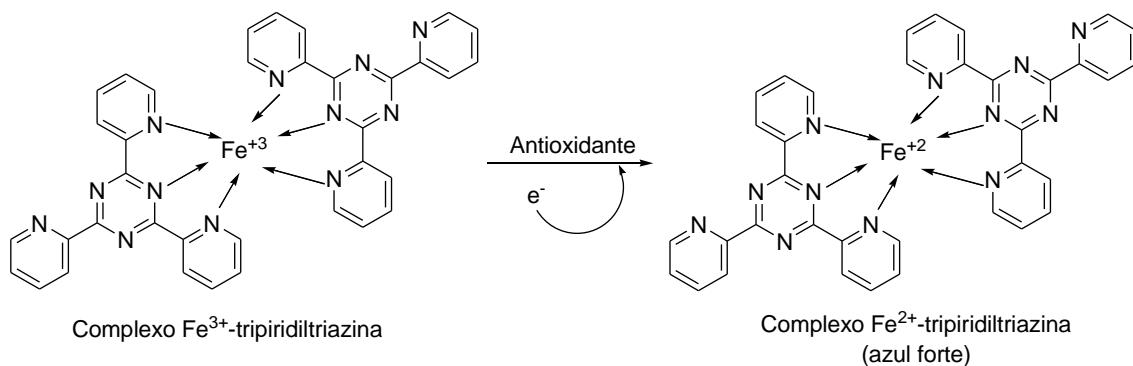


Figura 22. Representação da redução do complexo Fe^{3+} -TPTZ a Fe^{2+} -TPTZ a partir de uma substância com potencial antioxidante.

Fonte: Gülçin, 2012, p. 364.

Neste ensaio, o complexo de Fe^{2+} formado na presença de compostos com ação antioxidante apresenta coloração azul, o que permite o monitoramento da atividade redutora da amostra a partir da leitura da absorbância da solução formada. Nesse sentido, foram avaliadas neste ensaio diferentes concentrações do óleo essencial das flores (1 – 500 μ g/mL) e folhas (10 – 2000 μ g/mL), onde os resultados podem ser evidenciados na Figura 23 abaixo. Concentrações superiores a 500

$\mu\text{g/mL}$ do óleo essencial das flores não puderam ser avaliadas em razão da turbidez apresentada na solução.

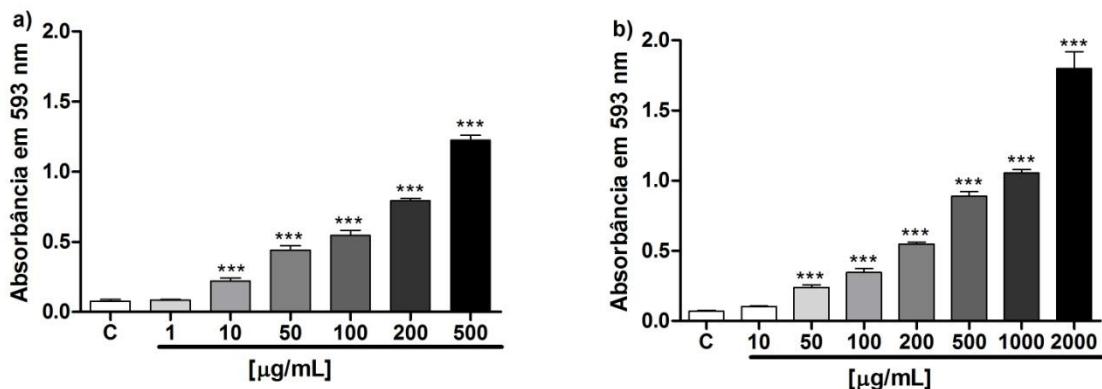


Figura 23. Efeito do óleo essencial das flores (a) e folhas (b) de *T. minuta* no ensaio do potencial redutor do íon férrico (Fe^{3+}) (FRAP). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão, ($n=5$). Os asteriscos representam efeitos significativos * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com o grupo de controle (C), sem óleo essencial, (one-way ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls de comparações múltiplas).

De acordo com a figura acima, podemos evidenciar uma leve melhora nos resultados apresentados pelo óleo essencial das flores frente ao óleo essencial das folhas, quando comparados até a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$. Entretanto, cabe ressaltar que os resultados obtidos evidenciam a capacidade de transferência de elétrons dos compostos presentes no óleo essencial das flores e folhas de *T. minuta*, mostrando que seu mecanismo de ação antioxidante está baseado na estabilização por transferência de elétrons.

Dessa forma, podemos evidenciar a ação antioxidante dos óleos essenciais das flores e folhas de *T. minuta*, a partir dos resultados obtidos no ensaio do potencial redutor antioxidante dos íons Fe^{3+} , uma vez que ambos os óleos essenciais conseguiram reduzir, embora em proporções diferentes, os íons férrico a ferroso, diminuindo a formação de espécies reativas, em um mecanismo de ação semelhante a reação de Haber-Weiss (Re et al., 1999).

2.5.1.6 Ensaio de avaliação da capacidade quelante do íon ferroso (Fe^{2+})

As espécies elementares como o íon ferroso, por exemplo, podem proporcionar a produção de espécies reativas de oxigênio dentro de sistemas biológicos a partir de reações de Fenton e Haber-Weiss, resultando na geração de

radicais hidroxil e estimulando a peroxidação lipídica (Niki, 2009; Fan et al., 2011). Nesse contexto, substâncias que apresentam capacidade de quelar o íon ferroso podem também ser consideradas como substâncias com capacidade antioxidante, capazes de reduzir ou retardar a oxidação de biomoléculas catalisadas por metais de transição (Gülçin et al., 2010).

Assim, os óleos essenciais de *T. minuta* foram avaliados com relação a sua capacidade quelante do íon ferroso em diferentes concentrações (Figura 24). Para o óleo essencial das flores, foram testadas amostras com concentrações de 10 – 500 µg/mL, onde se pode evidenciar uma pequena capacidade quelante nas concentrações de 50, 100, 200 e 500 µg/mL. Entretanto, o óleo essencial das folhas não apresentou atividade significativa neste ensaio em nenhuma das concentrações testadas (10 – 500 µg/mL).

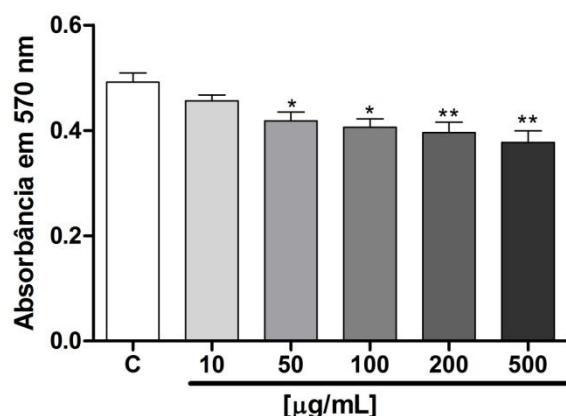


Figura 24. Efeito do óleo essencial das flores de *T. minuta* na capacidade quelante do íon ferroso. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão, (n=3). Os asteriscos representam efeitos significativos * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com o grupo de controle (C), sem óleo essencial, (one-way ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls de comparações múltiplas).

2.5.1.7 Avaliação da atividade superóxido dismutase (SOD-like) *in vitro*

A superóxido dismutase (SOD) é um eficiente mecanismo de defesa antioxidante enzimático apresentado pelo organismo animal, sendo responsável pela eliminação dos efeitos tóxicos do metabolismo do oxigênio, o radical ânion superóxido. Esta enzima é responsável por converter o radical ânion superóxido em

peróxido de hidrogênio e oxigênio, espécies menos agressivas ao organismo vivo (Battin & Brumaghim, 2009). Ao realizar-se o experimento *in vitro* que simula a ação da enzima superóxido dismutase, pode-se evidenciar que o óleo essencial das flores e folhas de *T. minuta* não apresentou efeito significativo frente ao controle, conforme podemos evidenciar na Tabela 8.

Tabela 8. Efeito dos óleos essenciais das flores e folhas de *T. minuta* no ensaio Superóxido dismutase *in vitro*^a.

Concentração (µg/mL)	Flores	Folhas
Controle	0,438 ± 0,169	0,438 ± 0,169
1	0,428 ± 0,155	0,431 ± 0,140
10	0,428 ± 0,166	0,405 ± 0,091
50	0,426 ± 0,129	0,392 ± 0,083
100	0,452 ± 0,147	0,403 ± 0,048
200	0,533 ± 0,219	0,435 ± 0,022

^aOs valores são expressos em média ± desvio padrão (n=3). Os resultados foram comparados com o respectivo controle, sem óleo essencial, (one way – ANOVA/Newman-keuls).

2.5.1.8 Determinação da peroxidação lipídica num sistema de emulsão com ácido linoleico

A peroxidação lipídica pode ocasionar diferentes tipos de danos a biomoléculas, dentre estes pode ser destacado a oxidação de lipídeos de membrana, proporcionando a diminuição da fluidez de membrana, inativação de receptores, enzimas e também de canais iônicos (Halliwell, 1995; Niki, 2010). Nesse sentido, a capacidade de diminuir a peroxidação lipídica é considerada uma potente atividade antioxidante.

Para verificar esta capacidade antioxidante no óleo essencial das flores e folhas de *T. minuta*, se utilizou no ensaio diferentes concentrações de óleo essencial, 0,1 – 3000 µg/mL para as flores e 10 – 3000 µg/mL para o óleo essencial das folhas, respectivamente, onde os resultados obtidos estão representados na Figura 25.

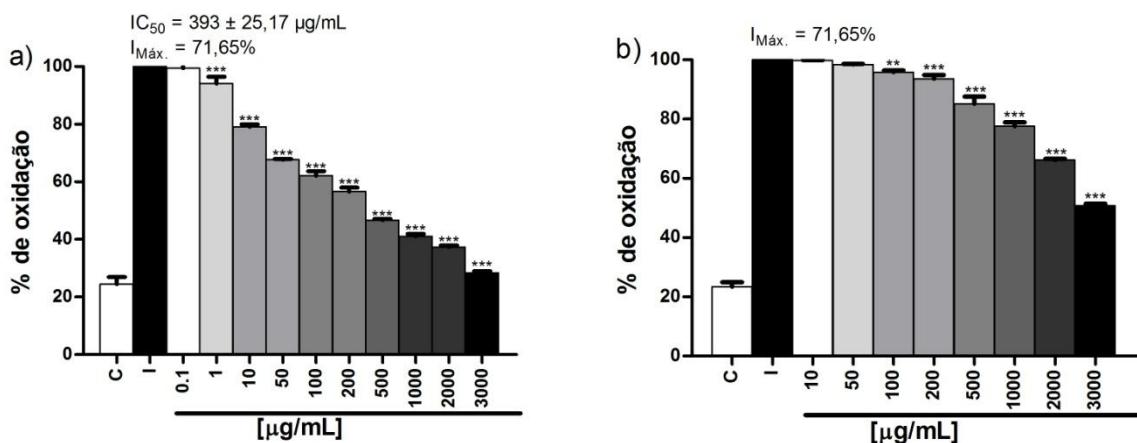


Figura 25. Efeito do óleo essencial das flores (a) e folhas (b) de *T. minuta* frente ao ensaio da peroxidação lipídica. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão, os experimentos foram realizados em duplicata ($n = 3$). A peroxidação lipídica foi induzida por Fe - ácido ascórbico (I); Os asteriscos representam efeitos significativos * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com o grupo de controle, sem óleo essencial, (one-way ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls de comparações múltiplas). IC_{50} – concentração necessária do óleo essencial para inibir metade dos radicais livres presentes em solução. $I_{\text{Máx.}}$ – inibição máxima observada do óleo essencial no ensaio.

A partir da Figura 25 podemos evidenciar que o óleo essencial das flores (a) inibiu significativamente a peroxidação lipídica induzida por $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e ácido ascórbico a partir da concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, apresentando uma $I_{\text{Máx.}}$ de 71,65% na concentração de 3000 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que o óleo essencial das folhas (b) apresentou um efeito significativo a partir da concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, e uma $I_{\text{Máx.}}$ de 49,18% também na concentração de 3000 $\mu\text{g/mL}$. Nesse sentido, podemos evidenciar novamente uma melhor capacidade protetora, atividade antioxidante, apresentada pelo óleo essencial das flores quando comparadas ao óleo essencial das folhas de *T. minuta*. Entretanto, é valido ressaltar que este ensaio avalia a proteção de compostos lipídicos sintéticos, não sendo utilizados tecidos de origem animal.

2.5.2 Ensaios com tecido animal

2.5.2.1 Avaliação da atividade enzimática da δ -Aminolevulinato Desidratase (δ -ALA-D) em fígado e rim de ratos

A enzima δ -Aminolevulinato Desidratase (δ -ALA-D) apresenta uma elevada sensibilidade a agentes com capacidade oxidante e ao estresse oxidativo (Prauchner et al., 2011). Nesse sentido, o ensaio que avalia a inativação da enzima δ -ALA-D, também pode ser utilizado com um ensaio que avalia a toxicidade das substâncias testadas, onde os resultados obtidos estão expressos nas Figuras 26 e 27 abaixo.

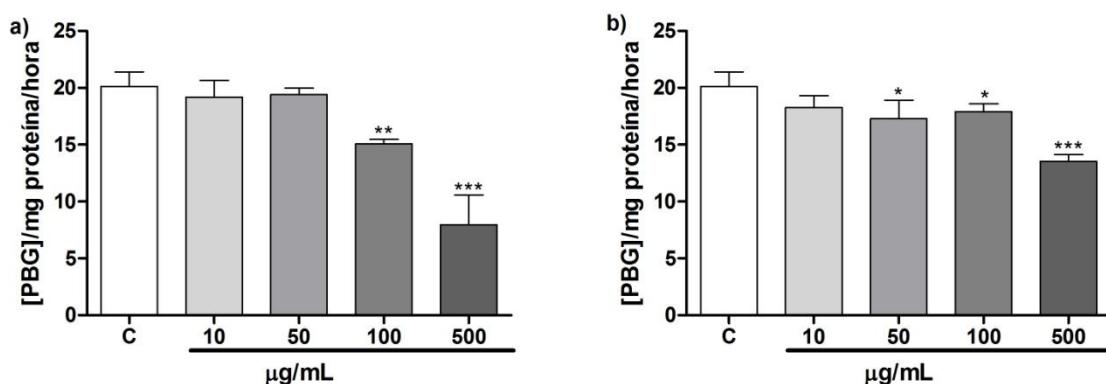


Figura 26. Efeito do óleo essencial das flores (a) e folhas (b) de *T. minuta* no ensaio da enzima δ -ALA-D no fígado de ratos. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão, os experimentos foram realizados em duplicata ($n = 3$). Os asteriscos representam efeitos significativos * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com o grupo de controle, sem óleo essencial, (one-way ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls de comparações múltiplas).

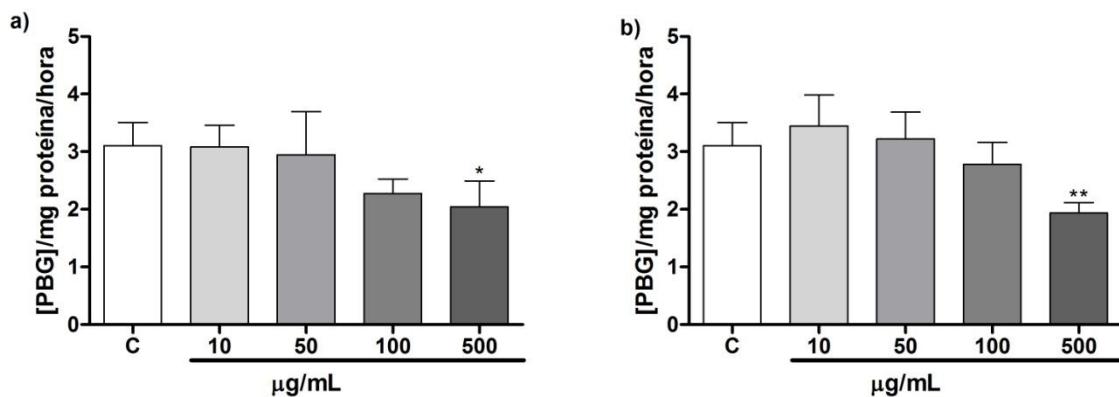


Figura 27. Efeito do óleo essencial das flores (a) e folhas (b) de *T. minuta* no ensaio da enzima δ-ALA-D no rim de ratos. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão, os experimentos foram realizados em duplicata ($n = 3$). Os asteriscos representam efeitos significativos * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com o grupo de controle, sem óleo essencial, (one-way ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls de comparações múltiplas).

De acordo com as Figuras 26 e 27, podemos evidenciar que a atividade da enzima δ-ALA-D foi inibida nos tecidos de fígado e rim de ratos em concentrações elevadas quando utilizados ambos os óleos essenciais. Entretanto, sua toxicidade foi mais elevada no fígado dos animais experimentados. Assim, observou-se diminuição da atividade enzimática no fígado de ratos, quando se utilizou o óleo essencial das flores nas concentrações de 100 e 500 µg/mL, enquanto que o óleo essencial das folhas apresentou um efeito significativo diminuindo a atividade enzimática nas concentrações de 50 – 500 µg/mL, logo apresentando um indicativo pré-liminar de maior toxicidade quando comparado ao óleo essencial das flores. Já com relação a atividade da enzima nos rins de ratos, pode-se evidenciar que o óleo essencial das flores e folhas foi menos tóxico, apresentando efeito significativo somente na concentração de 500 µg/mL.

A enzima δ-ALA-D contém grupos sulfidrílicos em sua estrutura, e é responsável pela condensação de duas moléculas de ácido δ-aminolevulínico (ALA), formando um precursor do grupo heme, o porfobilinogênio (PBG) (Nogueira & Rocha, 2012). Nesse sentido, a inibição da enzima δ-ALA-D pode inibir a biossíntese do heme, afetando o metabolismo de transporte de oxigênio, podendo desencadear uma ação pró-oxidante.

Entretanto, é valido ressaltar ainda que estes resultados obtidos a partir de ensaios *in vitro* apenas são um indicativo pré-liminar da ação destes compostos,

sendo que a influência do tratamento com ambos os óleos essenciais deve ser avaliada experimentalmente a partir de ensaios *in vivo*. Dessa forma, se faz necessária a realização de outros experimentos para avaliar a inativação da enzima δ-ALA-D, bem como a toxicidade dos óleos essenciais testados.

2.5.2.2 Determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) – basal em fígado, rim e estruturas cerebrais (córtex, hipocampo e cerebelo) de ratos

A peroxidação lipídica foi analisada e mensurada neste ensaio, a partir da formação de malondialdeídos (MDA), produto da peroxidação lipídica em reações que consideram espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Para realização deste ensaio, foram escolhidas três estruturas cerebrais (córtex, hipocampo e cerebelo), fígado e rim de ratos, os quais desempenham importantes funções biológicas. Nesse sentido, o córtex é uma estrutura rica em lipídeos e é responsável pelo desenvolvimento de funções sofisticadas do sistema neurológico, como desenvolvimento da linguagem e pensamento. Já o hipocampo é responsável pela consolidação da memória, enquanto que o cerebelo é responsável pelo desenvolvimento do equilíbrio motor e pelo controle do tônus muscular. O fígado é responsável pelo metabolismo do colesterol. Já o rim é responsável por excretar substâncias tóxicas que são formadas ou que estão presentes no organismo animal.

Os resultados obtidos a partir da realização do ensaio, podem ser observados nas ilustrações descritas na Figura 28 abaixo, evidenciando que o óleo essencial das folhas não protegeu os tecidos cerebrais de ratos da peroxidação lipídica, uma vez que o tratamento com o óleo essencial das folhas, não diminuiu significativamente os índices de oxidação dos tecidos quando comparados ao controle, amostra sem tratamento.

Outro fato relevante a ser destacado, é que em concentrações elevadas do tratamento com o óleo essencial das folhas (100 µg/mL) no córtex, este apresentou caráter oxidante, ou seja, auxiliou na oxidação deste tecido. Entretanto, o mesmo não foi observado para os outros tecidos analisados, cerebelo e hipocampo.

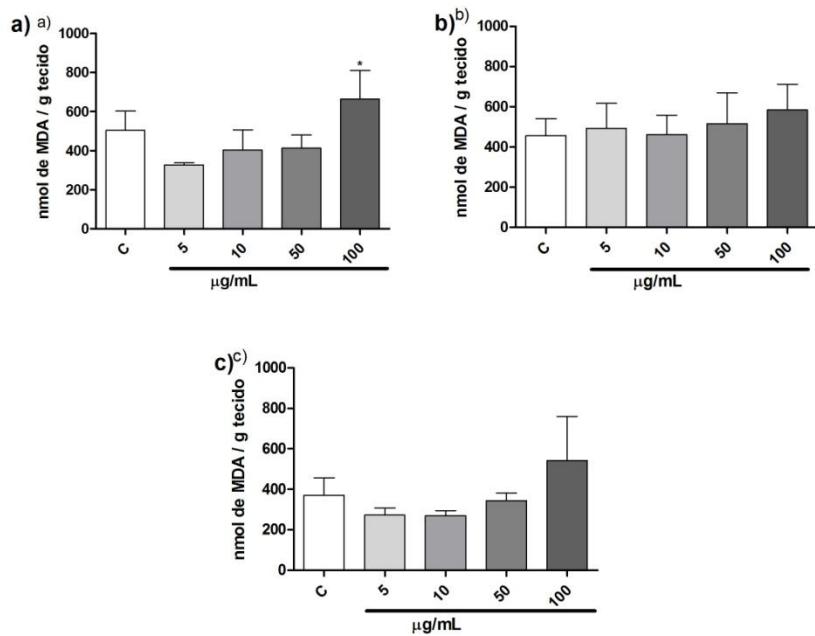


Figura 28. Efeito do óleo essencial das folhas no ensaio de TBARS nos tecidos de (a) córtex, (b) cerebelo e (c) hipocampo de ratos. Os resultados estão expressos como nmol de malondialdeído (MDA)/g de tecido. O asterisco representa o efeito significativo * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo de controle, sem óleo essencial, (one-way ANOVA seguido por teste de Newman-Keuls de comparações múltiplas).

Quando se analisou a peroxidação lipídica no fígado e nos rins de ratos adultos, pode-se observar que o óleo essencial das folhas de *T. minuta* (Figura 29) também não protegeu estes tecidos dos danos oxidativos a que foram expostos. Entretanto, um fator positivo verificado é que em nenhuma das concentrações testadas nestes tecidos o óleo essencial induziu a peroxidação lipídica.

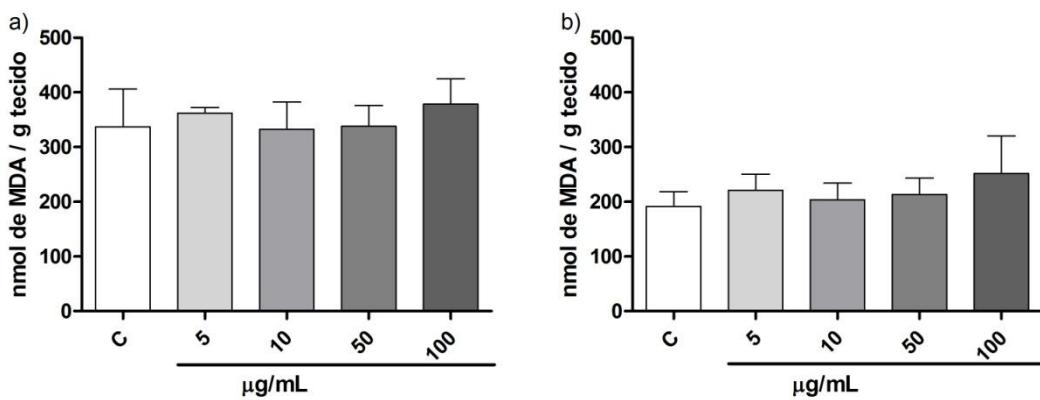


Figura 29. Efeito do óleo essencial das folhas no ensaio de TBARS nos tecidos fígado (a) e rim (b) de ratos. Os resultados estão expressos como nmol de malondialdeído (MDA)/g de tecido.

Em contrapartida, ao analisarmos o óleo essencial das flores de *T. minuta* podemos evidenciar que a amostra também não apresentou atividade antioxidante significativa, embora seja possível a observação de uma diminuição da oxidação lipídica nos tecidos quando se observa os gráficos abaixo (Figura 30). Ao realizar o experimento também se pode observar que o óleo essencial das flores não apresentou atividade pró-oxidante nas concentrações testadas.

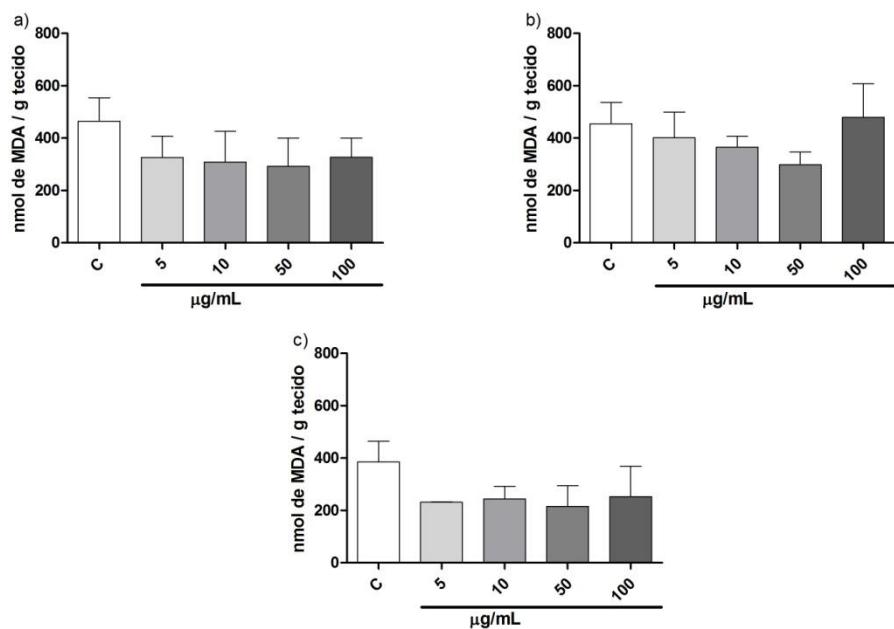


Figura 30. Efeito do óleo essencial das flores de *T. minuta* no ensaio TBARS em estruturas cerebrais a) córtex, b) cerebelo e c) hipocampo de ratos. Os resultados estão expressos como nmol de malondialdeído (MDA)/g de tecido.

Os ensaios realizados com tecido de fígado e rim de ratos adultos indicaram que o óleo essencial das flores de *T. minuta* também não protegeu os tecidos da peroxidação lipídica, entretanto o mesmo não atuou como um pró-oxidante o que também é um bom resultado, conforme os resultados expostos na Figura 31.

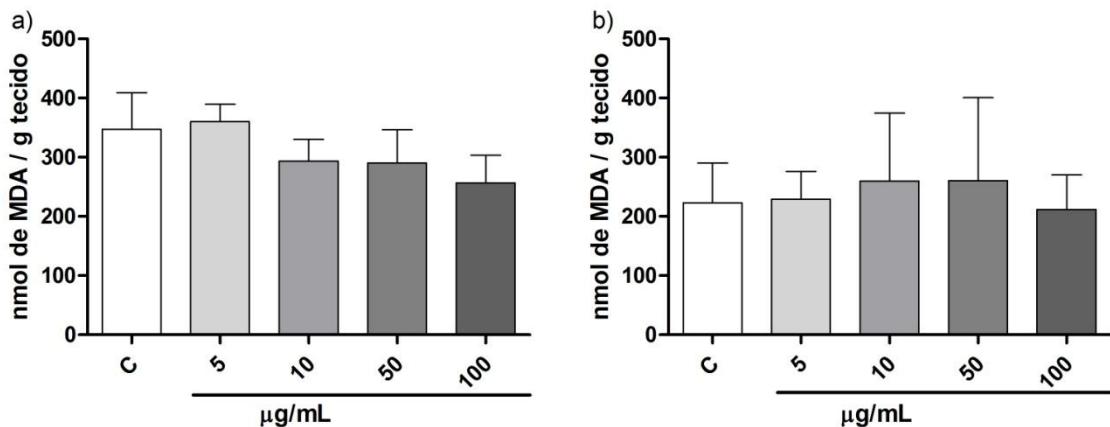


Figura 31. Efeito do óleo essencial das flores de *T. minuta* no ensaio de TBARS nos tecidos de fígado (a) e rim (b) de ratos. Os resultados estão expressos como nmol de maldialdeído (MDA)/g de tecido.

Assim, de modo geral pode-se afirmar que o óleo essencial das flores e folhas de *T. minuta*, não apresentou, inicialmente, capacidade de inibir a peroxidação lipídica em tecidos de ratos adultos (fígado, rim, córtex, hipocampo e cerebelo). Entretanto, também não foi evidenciada capacidade pró-oxidante significativa dos mesmos nas concentrações testadas.

De modo geral, cabe ressaltar que outros ensaios devem ser realizados, *in vivo*, para que se possa avaliar a real capacidade de proteção/oxidação de ambos os óleos essenciais testados, flores e folhas de *T. minuta*.

2.6 Avaliação da capacidade antifúngica do óleo essencial das flores e folhas de *T. minuta*

Os óleos essenciais das flores e folhas de *T. minuta* foram avaliados com relação a capacidade de inibição frente a quatro espécies de fungos, sendo elas: *Cândida guilhermondi*, *Cândida lipilityca*, *Cândida parapsilosis* e *Trichosporon asahii*.

Dentre os resultados obtidos e apresentados na Tabela 9 a seguir, pode-se verificar que os óleos essenciais testados, flores e folhas de *T. minuta*,

apresentaram resultados antifúngicos satisfatórios e semelhantes aos resultados obtidos com o fluconazol, indicando que os mesmos se apresentam como potentes alternativas farmacológicas futuras, entretanto estudos complementares ainda se fazem necessários.

Tabela 9. Concentração inibitória mínima observada para os óleos essenciais das flores e folhas de *T. minuta* no ensaio de atividade antifúngica.

Fungo	OE flores ($\mu\text{g/mL}$)	OE folhas ($\mu\text{g/mL}$)	Fluconazol ($\mu\text{g/mL}$)
<i>C. guilhermondi</i>	$62,380 \pm 44,310$	$70,130 \pm 15,250$	$62,50 \pm 0,000$
<i>C. lipolityca</i>	$46,750 \pm 18,190$	$62,50 \pm 0,000$	$31,250 \pm 0,000$
<i>C. parapsilosis</i>	$54,630 \pm 15,750$	$62,50 \pm 0,000$	$52,100 \pm 18,000$
<i>T. asahii</i>	$28,330 \pm 4,610$	$44,70 \pm 20,750$	$83,300 \pm 36,100$

Os valores estão dispostos como média \pm desvio padrão.

Os resultados experimentais acima descritos se apresentam como média \pm desvio padrão para evidenciar as possíveis variações entre os grupos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls. Nesse sentido, de acordo com a análise realizada, pode-se evidenciar que o MIC apresentado pelo óleo essencial das flores não diferiu significativamente dos resultados obtido para o fluconazol quando consideradas as cepas de *C. guilhermondi* e *C. parapsilosis*. Entretanto, sua inibição foi menos significativa que a evidenciada para o fluconazol, quando se procedeu ao ensaio com a cepa de *C. lipolityca*. Em contrapartida, os resultados obtidos para a levedura *T. asahii* apresentou um resultado significativo superior ao verificado para o fluconazol, antifúngico de referência.

Considerando-se os resultados obtidos para o óleo essencial das folhas de *T. minuta*, pode-se evidenciar uma proximidade na concentração inibitória mínima quando comparados ao fluconazol. Entretanto, os resultados obtidos, embora sejam satisfatórios, na maioria das vezes, foram inferiores aos evidenciados com o padrão, exceto quando analisada a levedura de *T. asahii*, onde os resultados obtidos foram superiores e diferentes significativamente.

Com base nos resultados obtidos, e nos dados expostos na literatura onde é relatado o potencial antifúngico apresentado por diferentes óleos essenciais tais como, OE de *Eugênia uniflora* (Victoria et al., 2012), OE de *Seseli tortuosum* e de

Seseli montanum subsp (Salgueiro et al., 2012) e de *Baccharis darwinii* (Freile et al., 2012), há de se considerar a utilização dos óleos essenciais como futuros candidatos a fármacos, uma vez que algumas cepas de fungos apresentam ou irão apresentar resistência aos medicamentos tradicionais, justificando as diferentes pesquisas relacionadas aos óleos essenciais.

Considerações Finais e Conclusão

Considerando-se os objetivos propostos para a realização deste trabalho e analisando os resultados obtidos, podemos evidenciar que a caracterização química e a determinação da capacidade antioxidante *in vitro* do óleo essencial das flores e folhas de *T. minuta* foram realizadas com sucesso.

Os óleos essenciais extraídos das flores e folhas de *T. minuta* por destilação por arraste a vapor, apresentaram um rendimento de 2,09% e 0,33% (m/m), respectivamente. No óleo essencial das flores de *T. minuta*, foram caracterizados 11 constituintes químicos diferentes em sua composição, os quais representam 98,75% do óleo essencial analisado. Seus constituintes majoritários identificados foram (*Z*) e (*E*)-tagetona **18** e **36**, (*Z*)- β -ocimeno **31**, di-hidrotagetona **30** e limoneno **34**, com concentrações relativas de 77%, 11%, 4% e 2% respectivamente. Este resultado difere do observado com relação as flores coletadas na Região Nordeste do Brasil, onde o constituinte majoritário observado na composição química do óleo essencial foi a di-hidrotagetona **30** (Craveiro et al., 1998). Nesse sentido, estes resultados vem confirmar que a composição química dos óleos essenciais estão diretamente relacionadas à região de cultivo.

Na composição química do óleo essencial das folhas de *T. minuta*, foram caracterizados 9 compostos majoritários, os quais representam 99,26% do óleo essencial analisado. Seus constituintes mais representativos foram identificados como di-hidrotagetona **30**, (*Z*) e (*E*)-tagetona (**18** e **36**) e limoneno **34**, com concentrações relativas de 57%, 34% e 2%, respectivamente.

Os óleos essenciais das flores e folhas de *T. minuta* apresentaram bons resultados com relação a sua capacidade antioxidante. Assim, ambos os óleos essenciais apresentaram efeitos significativos na neutralização dos radicais sintéticos de DPPH e ABTS. Entretanto, os melhores resultados foram observados no ensaio de neutralização dos radicais catiônicos de ABTS, o que sugere um mecanismo de ação antioxidante por compartilhamento de elétrons. Essa hipótese pode ser reafirmada a partir dos resultados obtidos no ensaio FRAP, o qual avalia o potencial do óleo essencial em reduzir espécies de íons férlico a ferroso presentes em solução, onde em ambos os casos, os óleos essenciais das flores e folhas de *T. minuta* apresentaram resultados significativos.

Outros ensaios também foram realizados para avaliar a capacidade antioxidante de ambos os óleos essenciais, onde os quais apresentaram efeito

significativo nos ensaios de neutralização do radical óxido nítrico e um pequeno efeito no potencial quelante do íon ferroso (somente para o óleo essencial das flores). Entretanto, estes óleos essenciais não apresentaram capacidade antioxidante nos ensaios de neutralização dos radicais hidroxila e avaliação da atividade *in vitro* da enzima superóxido dismutase (SOD).

O potencial antioxidante, na peroxidação lipídica, de ambos os óleos essenciais, foi avaliado de acordo com o ensaio sem a utilização de tecido animal, oxidação do ácido linoleico, onde ambos os óleos essenciais apresentaram bons resultados e a partir da determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS - basal) em tecidos de fígado, rim e estruturas cerebrais de ratos adultos, onde se pode evidenciar que os óleos essenciais não protegeram os tecidos da peroxidação lipídica, entretanto, também não atuaram como substâncias pró-oxidantes.

Os óleos essenciais das flores e folhas de *T. minuta*, quando avaliados frente a interação com a atividade da enzima δ-ALA-D, apresentaram a capacidade de inibir a atividade da enzima em concentrações elevadas em tecidos de fígado e rim de ratos adultos.

De acordo com o que foi exposto, pode-se concluir que ambos os óleos essenciais analisados, flores e folhas de *T. minuta* apresentam resultados *in vitro* satisfatórios com relação a sua capacidade antioxidante. Entretanto, novos ensaios *in vivo* devem ser realizados para que se possa estudar seu mecanismo de ação nos animais, buscando-se avaliar suas potencialidades farmacológicas.

Como perspectivas futuras para o desenvolvimento deste trabalho tem-se o desenvolvimento de experimentos para avaliar a capacidade antioxidante dos óleos essenciais das flores e folhas de *T. minuta* em modelo animal, além de isolar os compostos majoritários presentes nestes óleos essenciais para que possam ser analisados por RMN ¹H e de ¹³C. Os produtos isolados também serão submetidos aos testes de avaliação das atividades antioxidantes e antifúngica, para que se possa determinar se os efeitos biológicos observados para ambos os óleos essenciais são devidos aos componentes majoritários ou então da interação sinérgica de todos os compostos presentes nos óleos essenciais das flores e folhas de *T. minuta*. Posteriormente, os compostos majoritários isolados serão utilizados em síntese orgânica para inserção de grupos organocalcogênicos, os quais serão

submetidos novamente a ensaios de atividade biológica para verificar se ocorre um aumento ou decréscimo significativo nas potencialidades biológicas observadas.

Capítulo 3

Parte Experimental

3.1 Materiais e Métodos

3.1.1 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

Os cromatogramas e os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos a partir de um aparelho de espectroscopia de massas acoplado a um cromatógrafo a gás por impacto eletrônico de marca Shimadzu – modelo QP 2010, equipado com uma coluna cromatográfica RTx-5 (5% de grupo fenil e 95% de Dimetilpolisiloxano) com dimensões de 30 m comprimento, 0,25 mm diâmetro interno e 0,25 μm espessura de filme (Central Analítica – Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos – UFPel – Pelotas/RS). Os espectros foram obtidos através da diluição das amostras em hexano.

3.1.2 Espectroscopia no infravermelho

As análises de espectroscopia no infravermelho foram realizadas em um Espectrofotômetro da marca Shimadzu modelo IR Prestige-21 com transformada de Fourier, que abrange uma janela espectral de 4000 a 400 cm^{-1} (Central Analítica – Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de alimentos – UFPel – Pelotas/RS).

3.1.3 Análise estatística

Os resultados experimentais são mostrados como média \pm desvio padrão (DP) para evidenciar as variações entre os grupos. As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls quando apropriado. Todos os testes in vitro foram realizados pelo menos três vezes em duplicata. Os valores de IC₅₀ (concentração de amostra necessária para neutralizar 50% dos radicais livres) foram calculados a partir do gráfico do efeito da percentagem de inibição em função da concentração do composto. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas a uma probabilidade inferior a 5% ($p < 0,05$).

3.1.4 Solventes e Reagentes

Os solventes hexano, acetato de etila (AcOEt) e diclorometano foram purificados por destilação fracionada. Os reagentes utilizados foram obtidos de fonte comercial e utilizados sem prévia purificação. Os padrões de alcanos utilizados (C₈ a C₂₀) Sigma Aldrich, apresentavam grau de pureza superior a 99%. O óleo essencial das flores e folhas foi purificado por cromatografia em coluna (CC), utilizando-se gel de sílica 60 (230 – 400 mesh – MERCK) e, como eluente, uma mistura de solventes hexano/acetato de etila. As placas de cromatografia delgada (CCD) foram obtidas de fontes comerciais; Sílica G/UV₂₅₄ (0,20 mm). Utilizou-se, como método de revelação, cuba de iodo, luz ultravioleta e solução ácida de vanilina.

3.1.5 Animais e Material Biológico

Foram utilizados nos ensaios tecidos de ratos machos adultos da espécie *Rattus norvegicus* provenientes do biotério da Universidade Federal de Pelotas, os quais foram mantidos em caixas plásticas (41 x 34 x 16 cm) com cinco animais por caixa e livre acesso à água e comida. Os animais foram mantidos em um regime de fotoperíodo fixado em 12 h de exposição a luz e 12 h ao abrigo da luz, com temperatura ambiente de 22 ± 2 °C. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as orientações do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPel/ RS, Brasil (CEEA 2762).

Nos ensaios antifúngicos foram utilizadas cepas de fungos do gênero *Cândida* (*C. lipolytica*, *C. guilhermondi* e *C. parapsilosis*) e *Trichosporon Asahi* obtidas no departamento de microbiologia da Universidade Federal de Pelotas.

3.2 Procedimentos Experimentais

3.2.1 Amostragem

A planta *T. minuta* foi fornecida pela Embrapa Clima Temperado, lotada na Estação Experimental Cascata, onde foi identificada pelo Prof. Dr. Gustavo Schiedeck, pesquisador daquela instituição.

As amostras da espécie *T. minuta* (chinchilho) foram coletadas nos meses de abril e maio de 2012, sempre no período da manhã, na região da Cascata (9º distrito de Pelotas, Rio Grande do Sul), localizado a uma latitude 31°42'S e a uma longitude 52°24'O a uma altitude de 57 metros.

Os dados meteorológicos de temperatura mínima e máxima bem como o índice pluviométrico, da localidade de cultivo da planta, foram obtidos a partir de registros da Embrapa Clima Temperado, e estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10: Dados meteorológicos da localidade de cultivo de *T. minuta*.

		Março	Abril	Maio
Temperatura do ar (°C)	Máxima absoluta	35,4	30,2	27,3
	Média das máximas	27,7	21,9	22,6
	Média das médias	20,5	15,4	15,6
	Média das mínimas	15,3	11,0	11,3
Precipitação pluviométrica	Mínima absoluta	7,5	1,3	3,0
	Total mensal (mm)	72,8	60,0	8,5
	Máxima em 24h (mm)	23,6	25,0	3,6
	Dias com precipitação	9	5	5

3.2.2 Tratamento da amostra

As partes aéreas da amostra foram devidamente separadas em flores, folhas e caules. Posteriormente estas partes foram cortadas em pequenos pedaços de aproximadamente 2 cm (folhas e caules) e secas à temperatura ambiente ao abrigo da luz solar direta por sete dias, em ambiente com umidade controlada por um desumidificador ARSEC 160. Em seguida, foi realizada a extração do óleo essencial.

3.2.3 Extração do óleo essencial

Para realizar a extração do óleo essencial, foi colocado 200 g do material vegetal em um miniextrator de óleos essenciais de bancada modelo Linax – D1 (Figura 32) com capacidade para 1 kg de amostra, por quatro horas e em triplicata. O óleo essencial foi separado da fase aquosa com diclorometano em um funil de extração, e seco posteriormente com sulfato de magnésio ($MgSO_4$). A mistura contendo o óleo essencial foi rotaevaporada à temperatura de 30 °C até a completa evaporação do solvente. O óleo essencial obtido foi armazenado sob refrigeração a

± 10 °C e submetido às análises de CG-MS e infravermelho para realizar sua caracterização química.



Figura 32. Miniextractor de óleos essenciais de bancada.

3.2.4 Análise cromatográfica em CG-MS

Os óleos essenciais foram analisados num cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas. A programação utilizada no CG-MS para promover a separação e identificação dos constituintes presentes nos óleos essenciais está descrita na sequência. O forno iniciou sua rampa de aquecimento a 60 °C e aumentou 4 °C por minuto até atingir uma temperatura de 240 °C, onde permaneceu por 10 minutos. A temperatura de interface entre os equipamentos foi de 240 °C. Foram injetados no CG 1 μ L da solução de óleo essencial diluído em hexano, no modo split na razão de 1:10 utilizando Hélio como gás de arraste. A ionização das substâncias presentes no óleo essencial ocorreu pelo método de ionização por impacto de elétrons (70 eV), e o detector utilizado na análise para gerar os cromatogramas foi o detector de massas.

3.2.5 Cálculo do índice de Kovats

O índice de retenção de Kovats foi calculado através da equação de Kovats (Equação 1, pág. 18), a qual relaciona o tempo de retenção dos componentes da amostra ao tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos homólogos, utilizando-se uma solução padrão de hidrocarbonetos C₈ a C₂₀.

3.2.6 Determinação da capacidade antioxidante dos óleos essenciais das flores e folhas de *T. minuta*

Os protocolos experimentais utilizados para determinar o potencial antioxidante “*in vitro*” do óleo essencial das flores e folhas de *T. minuta* foram desenvolvidos no Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec, Unidade de Biotecnologia, no Laboratório do Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia (GPN) – UFPel, sob orientação da Prof. Dra Lucielli Savegnago, e estão descritos na Figura 33.

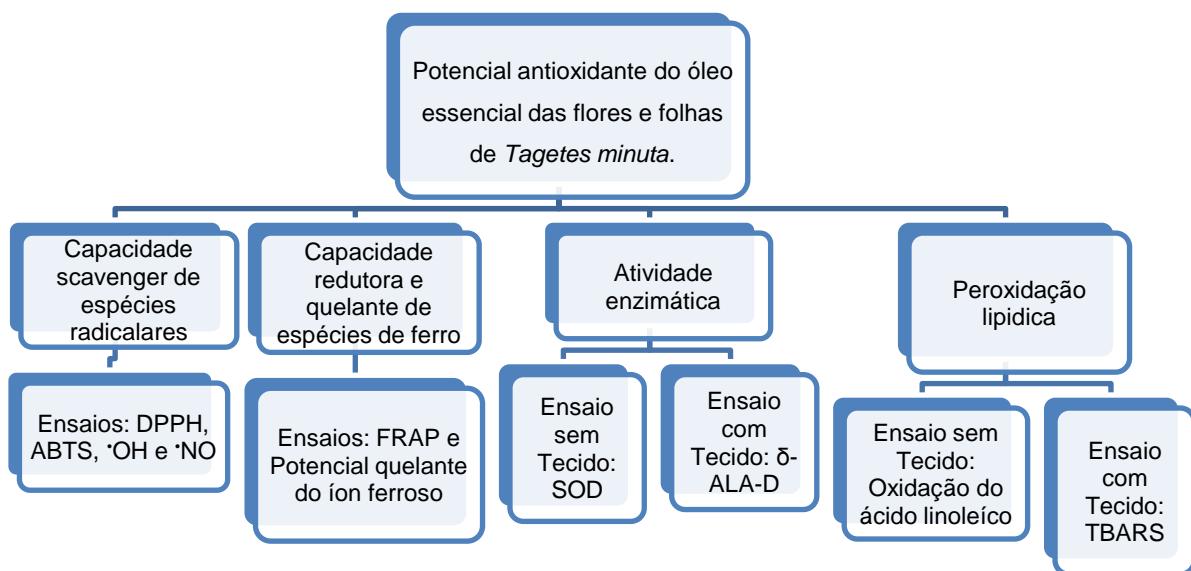


Figura 33. Determinação do potencial antioxidante “*in vitro*” dos óleos essenciais das flores e folhas de *T. minuta*. DPPH – 1,1-difenil-2-picril-hidrazil, ABTS – ácido 2,2-azinobis-(3-etylbenzotiazolina-6-sulfônico), ‘OH – radical hidroxila, ‘NO – radical óxido nítrico, FRAP – potencial redutor do íon ferroso, SOD – superóxido dismutase, δ-ALA-D – enzima δ-aminolevulinato desidratase e TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.

3.2.6.1 Ensaios sem a utilização de tecido animal

3.2.6.1.1 Ensaio de neutralização das espécies radicalares de 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH)

A atividade “scavenger” do radical de DPPH foi avaliada de acordo com o método descrito por Choi et al., (2002) com algumas modificações. Assim 10 μ L de uma solução com diferentes concentrações (10-3000 μ g/mL) de óleo essencial das flores e folhas de *T. minuta* foram misturados a 990 μ L de uma solução metanólica contendo os radicais de DPPH (50 μ M). Posteriormente, essa mistura foi agitada e incubada durante 30 min a 30 °C ao abrigo da luz. Em seguida, leu-se a absorbância num comprimento de onda de 517 nm, onde um decréscimo na absorbância indica a neutralização dos radicais de DPPH. Os resultados obtidos no ensaio foram calculados a partir da equação abaixo e expressos em porcentagem de inibição dos radicais de DPPH (decréscimo da absorbância) em relação aos valores do controle.

$$\% I_{DPPH} = [(A_c - A_a) / A_c] \times 100$$

Onde A_c é a absorbância do controle e A_a é a absorbância da amostra analisada.

3.2.6.1.2 Ensaio de neutralização das espécies radicalares do ácido 2,2-azinobis-(3-etylbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS⁺)

A avaliação da neutralização do radical cátion do ácido 2,2-azinobis-(3-etylbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS⁺) pelos óleos essenciais das flores e folhas de *T. minuta* foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Re e colaboradores (1999), com algumas modificações. Inicialmente, para se preparar a solução estoque de radicais ABTS⁺, foi misturado 10 mL de solução estoque de ABTS (7 mM) com 175 μ L da solução de persulfato de sódio (140 mM) ao abrigo da luz. A solução formada ficou em repouso sob refrigeração por 16 horas para que ocorra a formação dos radicais cátion de ABTS⁺.

No dia do ensaio, a solução contendo os radicais ABTS⁺ (solução estoque) foi diluída no tampão fosfato de potássio (5 mM, pH 7,4) na proporção de 1,47 mL para 100 mL. Depois de realizada a diluição, adicionou-se 10 μ L da solução de óleo essencial das flores (1-200 μ g/mL) e folhas (10-3000 μ g/mL) em um tubo de ensaio, em seguida, adicionou-se 990 μ L da solução contendo os radicais ABTS⁺⁺. A mistura

foi vigorosamente agitada e incubada ao abrigo da luz a temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período foi lida a absorbância da solução formada em 734 nm, onde a diminuição da absorbância indica a atividade antioxidante da amostra. Os resultados foram expressos em porcentagem de neutralização dos radicais ABTS⁺ em relação aos valores de controle, de acordo com a equação descrita abaixo, onde A_c é equivalente a absorbância do controle e A_a é a absorbância da amostra.

$$\% I_{ABTS\cdot+} = [(A_c - A_a) / A_c] \times 100$$

Onde A_c é a absorbância do controle e A_a é a absorbância da amostra analisada.

3.2.6.1.3 Ensaio de neutralização dos radicais hidroxila (OH[•])

A verificação da capacidade dos óleos essenciais em neutralizar os radicais hidroxila foi avaliada a partir de um método espectrofotométrico descrito por Smirnoff e colaboradores (1989). Foram adicionados em um tubo de ensaio e nesta ordem os seguintes reagentes: água, salicilato de sódio (20 mM), sulfato ferroso (1,5 mM), solução de diferentes concentrações (10-3000 µg/mL) do óleo essencial das flores e folhas de *T. minuta* e solução de peróxido de hidrogênio (6 mM). Posteriormente a mistura reacional foi vigorosamente agitada e incubada a 37 °C por 1 hora. A absorbância foi medida em 510 nm, onde a diminuição da absorbância indica a inibição da formação dos radicais hidroxila em solução. A atividade de neutralização do radical hidroxila pode ser determinada de acordo com a equação descrita a seguir, onde A_c é a absorbância do controle e A_a é a absorbância da amostra.

$$\text{Atividade scavenger do radical OH}^{\bullet} \% = [(A_c - A_a) / A_c] \times 100$$

Onde A_c é a absorbância do controle e A_a é a absorbância da amostra analisada.

3.2.6.1.4 Ensaio de neutralização do radical óxido nítrico (NO[•])

O ensaio que avalia a inibição da formação do radical óxido nítrico foi desenvolvido de acordo com o método descrito por Yen e colaboradores (2001) com algumas modificações. Adicionou-se 10 µL em tubos de ensaio de uma solução contendo óleo essencial de *T. minuta* em diferentes concentrações, flores (10-3000 µg/mL) e folhas (50-3000 µg/mL). Posteriormente, acrescentou-se uma solução aquosa de nitroprussiato de sódio (NPS, 25 mM), que é uma fonte geradora dos radicais óxido nítrico, incubando-se a mistura reacional por duas horas a 37 °C na presença de luz. Após o período de incubação, transferiu-se uma quantidade equivalente do reagente de Griess (250 µL) para o tubo de ensaio, onde a mistura foi homogeneizada e novamente incubada por 5 min à temperatura ambiente, fazendo-se a leitura da absorbância num comprimento de onda de 570 nm. A diminuição da absorbância indica a inibição da formação do radical óxido nítrico pela amostra testada.

3.2.6.1.5 Ensaio de avaliação da capacidade redutora do íon férrico (Fe³⁺) (FRAP)

O ensaio FRAP foi desenvolvido de acordo com o método elaborado por Stratil e colaboradores (2006) com algumas modificações. Esse método busca avaliar a capacidade da amostra em reduzir os íons férrico presente em solução aquosa. Para realizar o ensaio, foram utilizadas 10 µL de diferentes concentrações de uma solução do óleo essencial das flores (1-500 µg/mL) e folhas (10-1000 µg/mL) de *T. minuta*, as quais foram misturadas a 990 µL de uma solução de trabalho FRAP. Esta solução de trabalho foi preparada utilizando-se uma solução de triazina (10 mM), cloreto férrico (20 mM) e acetato de sódio (38 mM, pH=3,6). A reação foi misturada e incubada por 40 min a 37 °C ao abrigo da luz. Posteriormente foi realizada a leitura da absorbância da solução em um comprimento de onda de 593 nm, onde um aumento da absorbância em relação ao controle indica a capacidade redutora da amostra.

3.2.6.1.6 Ensaio de avaliação da capacidade quelante do íon ferroso

A propriedade quelante do óleo essencial das flores e folhas de *T. minuta* foi estudada de acordo com o método descrito por Stratil e colaboradores (2006) com algumas modificações. Nesse sentido, um volume de 10 µL de uma solução de óleo essencial de diferentes concentrações, flores (10-500 µg/mL) e folhas (10-200 µg/mL) de *T. minuta* foi misturado a 10 µL de uma solução de sulfato ferroso e 10 µL de triazina (5 mM em HCl 40 mM), sendo o volume ajustado para 500 µL com água destilada. O efeito quelante do íon ferroso foi monitorado pela absorbância do controle (máxima) em um comprimento de onda de 570 nm. O percentual de inibição da formação do complexo Fe²⁺ - triazina foi calculado pela equação:

$$\text{Efeito quelante de íons Fe}^{2+} (\%) = (A_c - A_a / A_c) \times 100$$

Onde A_c é a absorbância do controle e A_a a absorbância da amostra contendo o composto.

3.2.6.1.7 Avaliação da atividade superóxido dismutase (SOD-like) *in vitro*

A atividade SOD-*like* do óleo essencial das flores e folhas de *Tagetes minuta* foi avaliada de acordo com o método de Marklund & Martklund (1974), com algumas alterações. Assim, um volume de 10 µL da solução contendo o óleo essencial foi misturado a 980 µL de Tris-HCl em EDTA (50 mM, pH 8,5) e 10 µL de pirogalol, sendo incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado a essa mistura 500 µL de uma solução de HCl 1mol/L e após 10 minutos foi lida a absorbância em 420 nm. A atividade SOD-*like* pode ser determinada pelo decréscimo da absorbância em relação ao controle pela equação abaixo, onde A_c é a absorbância do controle e A_a é a absorbância da amostra contendo o óleo essencial.

$$\% \text{ SOD-}like = (A_c - A_a / A_c) \times 100$$

Onde A_c é a absorbância do controle e A_a é a absorbância da amostra analisada.

3.2.6.1.8 Avaliação da capacidade de inibição da oxidação do ácido linoléico

A avaliação da capacidade do óleo essencial das flores e folhas de *T. minuta* em inibir a peroxidação lipídica foi realizada de acordo com o método proposto por Ohkawa et al., (1979) com algumas modificações. A peroxidação lipídica foi induzida por Fe^{2+} - ácido ascórbico. Assim, foram pipetados em um tubo de ensaio o Tris-HCl (100 mM, pH 7,5), solução contendo o óleo essencial em diferentes concentrações, flores (1-3000 μ g/mL) e folhas (10-3000 μ g/mL), ácido linoleico (20 mM), sulfato ferroso (48,8 mM) e ácido ascórbico (24,4 mM). Posteriormente, os tubos foram vigorosamente agitados e incubados por 30 min a uma temperatura de 37 °C. Após o período inicial de incubação, a reação foi parada com a adição de solução de ácido tricloroacético (5,5%). Em seguida, transferiu-se uma alíquota do meio reacional para outro tubo de ensaio, adicionando-se uma quantidade equivalente de ácido tiobarbitúrico. As amostras foram novamente incubadas por 10 min a 90 °C, e posteriormente a reação foi parada com a adição dos tubos em banho de gelo. Para se proceder a análise pelo método espectrofotométrico, a fase orgânica da mistura reacional foi extraída com butanol, procedendo-se a leitura em um comprimento de onde de 532 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de oxidação, onde a oxidação do induzido foi considerada máxima e o decréscimo da oxidação (verificado pela diminuição da absorbância) indica um efeito positivo de proteção da peroxidação lipídica apresentada pelos óleos essenciais testados.

3.2.6.2 Ensaios com tecido animal

3.2.6.2.1 Preparação dos tecidos animais

Para realização dos ensaios, os ratos brancos adultos foram sacrificados em guilhotina e os tecidos (fígado, rim, córtex, cerebelo e hipocampo) foram imediatamente removidos, pesados e armazenados no gelo até o final do procedimento completo de homogeneização.

Os tecidos foram homogeneizados em solução tampão de Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) na seguinte proporção 1:10 para fígado e rim e 1:5 para as estruturas cerebrais. O homogeneizado foi centrifugado durante 10 minutos a 2000 rpm (25 °C)

e o sobrenadante obtido foi recolhido e utilizado nos ensaios para determinar os efeitos dos óleos essenciais em diferentes concentrações sobre os níveis de peroxidação lipídica e a atividade enzimática da δ -ALA-D.

3.2.6.2.2 Avaliação da atividade enzimática da δ -Aminolevulinato desidratase tecidual (δ -ALA-D)

A atividade da enzima δ -ALA-D foi determinada conforme o método exposto por Sassa (1982), onde é medida a taxa de formação do produto de porfobilinogênio (PBG). Inicialmente incubou-se por 10 min a 37 °C em um tubo de ensaio, 50 μ L da solução tampão fosfato de potássio (84 mM, pH 6,4), 140 μ L de água, 200 μ L de uma solução preparada com tecido animal (fígado e rim) e 10 μ L da solução de óleo essencial das flores e folhas de *T. minuta*. Posteriormente, adicionou-se o ácido aminolevulínico e incubou-se a mistura reacional por mais 1 hora. O produto da reação foi determinado utilizando-se o reagente de Ehrlich's modificado, fazendo-se a leitura da absorbância em 555 nm. A atividade enzimática foi expressa como nmol PBG/MG de proteína/hora.

3.2.6.2.3 Determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) basal em fígado, rim, córtex, hipocampo e cerebelo de ratos.

Os índices de peroxidação lipídica foram estimados neste trabalho considerando-se as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) a partir da medida de formação de malondialdeídos (MDA) presente em solução. Os MDA são um produto final da peroxidação lipídica, os quais reagem com TBA formando um cromógeno colorido, os quais podem ser determinados a partir de ensaios espectrofotométricos em uma absorbância de 532 nm.

Para este ensaio, foram utilizados tecidos de ratos homogeneizados em Tris-HCl nos respectivos volumes de solução: 10 μ L de hipocampo, 20 μ L de córtex e cerebelo e 100 μ L de fígado e rim. Estes tecidos foram pré-incubados por 1 hora a 37 °C juntamente com água, tratamento (óleo essencial das flores e folhas de *T. minuta*) e DMSO (quando avaliado o veículo da droga). Posteriormente, adicionou-se a mistura reacional ácido tiobarbitúrico (0,8%), ácido acético (pH 3,4) e sulfato

dodecil de sódio (8,1%, SDS). Esta mistura foi vigorosamente agitada e novamente incubada por 2 horas a 95 °C. Após esse período, a solução foi resfriada e fez-se a leitura em 532 nm.

3.2.7 Determinação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *T. minuta*

Os fungos foram semeados com auxílio de uma alça de platina na superfície de um meio de cultura PDA e incubados em uma estufa microbiológica a 37 °C por 24 horas.

Posteriormente, foram preparados inóculos em solução salina estéril a 0,89% das linhagens de fungos testadas e ajustadas a escala de Mc Farland (0,5 UFC/mL), mantidas a temperatura ambiente. A determinação da concentração inibitória mínima dos óleos essenciais das flores e folhas de *T. minuta* foi verificada pela técnica de microdiluição (NCCLS, 2002) em placas de ELISA com noventa e seis poços estéreis. Assim, foram distribuídos 100 µL de caldo RPMI + MOPS (meio de cultura) em todos os orifícios das placas. Em seguida, acrescentou-se 100 µL de uma solução de óleo essencial dissolvido em DMSO com concentração inicial de 1 mg/mL na segunda coluna da placa. Posteriormente, realizou-se uma diluição seriada até a linha 11, onde foram retirados 100 µL da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora. Entretanto, na linha 11 foram descartados 100 µL de solução para que todos os poços obtivessem o mesmo volume final. Em seguida, acrescentou-se sobre os poços a partir da linha 2 até a linha 12, um volume de 100 µL do inóculo contendo as cepas dos fungos a serem testados. A linha 1 foi reservada para controle negativo, e a linha 12 foi reservada para controle positivo das cepas testadas. As placas foram incubadas ao final do ensaio, por 48 horas em estufa microbiológica a uma temperatura de 37 °C. Após esse período foi realizada a leitura das placas através do método visual, observando-se a formação ou não de aglomerados celulares, considerando-se como a concentração inibitória mínima a menor concentração do produto em teste onde não foram visualizados o crescimento de colônias. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada óleo essencial analisado, e o padrão utilizado como referência de atividade antifúngica foi o fluconazol.

Referências Bibliográficas

- Adams, R.P., **1995**. Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectroscopy. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation.
- Angioni, A.; Barra, A.; Coroneo, V.; Dessi, S.; Cabras, P., **2006**. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *Stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4364-4370.
- Arabshahi-Delouee, S.; Urooj, A., **2007**. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chem.* 52, 524-5244.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., **2008**. Biological effects of essential oils: a review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446-475.
- Barbosa, F.F.; Bandeira, J.M.; Rodrigues, L.M.P.; Bacarin, I.C.S.; Peters, M.A.; Braga, E.B., **2010**. Essential oil composition of four *Plectranthus* species. *Rev. Bras. Plantas Med.* 13, 157-164.
- Belavilaqua, C.M.; Macedo, I.T.; Oliveira, L.M.; Camurça-Vasconcelos, A.L.; Morais, S.M.; Machado, L.K.; Ribeiro, W.L., **2012**. In vitro activity of *Lantana camara*, *Alpinia zerumbet*, *Mentha villosa* and *Tagetes minuta* decoctions on *Haemonchus contortus* eggs and larvae. *Vet. Parasitol.* 190, 504-509.
- Bonato, P.S.; Collins, C.H.; Braga, G.L., Fundamentos de cromatografia. 1^a ed. São Paulo: UNICAMP, **2006**. 453p.
- Burt, S., **2004**. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223-253.
- Briskin, D.B., **2000**. Medicinal Plants and Phytomedicine. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. *Plant Physiol.* 124, 507-514.
- Cowan, M.M., **1999**. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 564-582.
- Chalchat, J.C., Garry, R.P., Muhayimana, A., **1995**. Essential oil of *Tagetes minuta* from Rwanda and France: Chemical composition according to harvesting location, growth stage and part of plant extracted. *J. Essent. Oil Res.* 7, 375-376.
- Chamorro, E.R., Ballerini, G., Sequeira, A.F., Velasco, G.A., Zalazar, M.F., **2008**. Chemical composition of essential oil from *Tagetes minuta* L. leaves and flowers. *J. Argent. Chem. Soc.* 96, 80-86.

- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K., **2002**. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci.* 163, 1161-1168.
- Craveiro, A.A., Matos, F.J.A., Machado, M.I.L., Alencar, J.W., **1988**. Essential oils of *Tagetes minuta* from Brazil. *Perfum. & Flavor.* 13, 35-36.
- Degenhardt, J.; Köllner, T.G.; Gershenzon, J., **2009**. Monoterpene and sesquiterpenes synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* 70, 1621-1637.
- Dharmagadda, V.S.S.; Naik, S.N.; Mittal, P.K.; Vasudevan, P., **2005**. Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. *Bioresour. Technol.* 96, 1235-1240.
- Elisabetsky, E.; Wannmacher, L., **1993**. The status of ethnopharmacology in Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 38, 131-143.
- Fan, M.; Goodwin, M.E.; Birrer, M.J.; Chambers, T.C., **2001**. The c-Jun NH(2) terminal protein kinase/AP-1 pathway is required for efficient apoptosis induced by vinblastine. *Cancer Res.* 61, 4450-4458.
- Frazier, W.C.; Westhoff, D.C. *Microbiologia dos alimentos.* 2^a ed. São Paulo: Atheneu, **1993**. 681p.
- Freile, M.; Kurdelas, R.R.; López, S.; Lima, B.; Feresin, G.E.; Zygadlo, J.; Zacchino, S.; López, M.L., **2012**. Chemical composition, anti-insect and antimicrobial activity of *Baccharis darwinii* essential oil from Argentina, Patagonia. *Ind Crop Prod.* 40, 261-267.
- Garg, S.N., Mehta, V.K., **1998**. Acyclic monoterpenes from the essential oil of *Tagetes minuta* flowers. *Phytochemistry.* 48, 395-396.
- Gill, A., Ghersa, C.M., Leicach, S., **2000**. Essential oil yield and composition of *Tagetes minuta* accessions from Argentina. *Biochem. System. Ecol.* 28, 261-274.
- Gülçin, I., Elmastas, M., Aboul-Enein, H.Y., **2010**. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. *Arabian J. Chem.* 5, 489-499.
- Gülçin, I., **2012**. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol.* 86, 345-391.
- Há, B.J.; Lee, S.H.; Kim, H.J.; Lee, J.Y., **2006**. The role of *salicornia herbacea* in ovariectomy-induced oxidative stress. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 1305-1309.

- Hajhashemi, V.; Ghannadi, A.; Sharif, B., **2003**. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *J. Ethnopharmacol.* 89, 67-71.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., **1990**. Role of free radicals and catalitic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol.* 186, 1-85.
- Halliwell, B., Murcia, M.A., Chirico, S., Aruoma, O.I., **1995**. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35, 7-20.
- Katerere, D.; Graziani, G.; Thembo, K.; Nyazema, N.; Ritieni, A., **2012**. Antioxidant activity of some African medicinal and dietary leafy African Vegetables. *Afric. J. Biothechn.* 11, 4103-4108.
- Kejlová, K.; Jirova, D.; Bendova, H. Gajdos, P.; Kolarova, H., **2010**. Phototoxicity of essential oils intended for cosmetic use. *Toxicol in vitro.* 24, 2084-2089.
- López, M.L., Bonzani, N.E., Zygladlo, J.A., **2009**. Allelopathic potential of *Tagetes minuta* terpenes by a chemical, anatomical and phytotoxic approach. *Biochem. Syst. Ecol.* 36, 882-890.
- Lopez, M.; Lopez, S.; Aragon, L.M.; Tereschuk, M.L.; Slanis, A.C.; Feresin, G.E.; Zygladlo, J.; Tapia, A.A., **2011**. Composition and anti-insect activity of essential from *Tagetes* L. species (Asteraceae, Helenieae) on *Ceratitis capitata* wiedemann and *Triatoma infestans* Klug. *J. Agric. Food Chem.* 59, 5286-5292.
- Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2^a ed. São Paulo: Nova Odessa, **2008**. 576p.
- Macedo, I.; Beviláqua, C.; Oliveira, L.; Vasconcelos, A.; Morais, S.; Machado, L.; Ribeiro, W., **2012**. *In vitro* activity of *Lantana camara*, *Alpinia zerumbet*, *Mentha villosa* and *Tagetes minuta* decoctions on *Haemonchus contortus* eggs and larvae. *Vet. Parasitol.* 190, 504-509.
- Masotti, V.; Juteau, F.; Bessière, J.M.; Viano, J., **2003**. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7115-7121.
- Marklund, S. Marklund, G., **1974**. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, 469-474.

- Melo, E.J.M.; Raposo, M.J.; Lisboa, J.A.; Diniz, M.F.A.; Marcelino, C.A.C., **2002**. Medicinal plants in the healing of dry socket in rats: Microbiological and microscopic analysis. *Phytomedicine*. 9, 109-116.
- Naik, G.H., Priyadarsini, K.I., Satav, J.G., Banavalikar, M.M., Sohoni, D.P., Biyani, M.K., Mohan, H., **2003**. Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in ayurvedic medicine. *Phytochemistry*. 63, 97-104.
- Niki, E., **2009**. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biol. Med.* 47, 469-484.
- Niki, E., **2010**. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo – review. *Free Radical Biol. Med.* 49, 503-515.
- Nogueira, C.W.; Rocha, J.B.T., **2011**. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch. Toxicol.* 85, 1313-1359.
- Nchu, F.; Magano, S.; Eloff, J., **2012**. *In vitro* anti-tick properties of the essential oil of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) on *Hyalomma rufipes* (Acari: Ixodidae). *J. Vet. Research*. 79, 358-363.
- NCCLS, **2002**. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In: Twelfth International Supplement, M100-S12. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pennsylvania, USA.
- Oboh, G. Puntel, R.L., Rocha, J.B.T., **2007**. Hot pepper (*Capiscum annuum*, *Tepin* and *Capiscum Chinese*, Habanero) prevents Fe^{2+} -induced lipid peroxidation in brain-in vitro. *Food Chem.* 102, 178-185.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., **1979**. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351-358.
- Ozen, T., Demirtas, I., Aksit, H., **2011**. Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *Skorpilii* var. *skorpilii*. *Food Chem.* 124, 58-64.
- Olas, B.; Saluk-Juszczak, J.; Pawlaczyk, I.; Kolodziejczyk, J.; Ponczek, M.; Nowak, P.; Tsirigotis-Woloszczak, M.; Wachowicz, B.; Gancarz, R., **2010**. The effect of polyphenolic-polysaccharide conjugates from selected medicinal plants of Asteraceae family on the peroxynitrite-induced changes in blood platelet proteins. *Int. J. Biol. Macromo.* 47, 700-705.

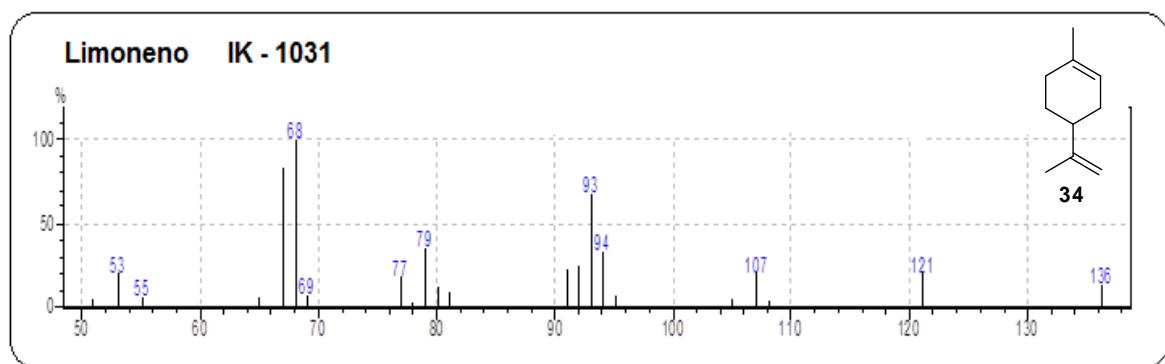
- Onofre, S.B.; Ferronato, R.; Santos, A.C., **2008**. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). Rer. Bras. Farmacogn. 18, 379-386.
- Pacher, P., Beckman, J.S., Liaudet, L., **2007**. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiol. Rev. 87, 315-424.
- Pichersky, E.; Noel, J.P.; Dudareva, N., **2006**. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. Science 311, 808-811.
- Poletto, F. Farmacognosia I. 1^a ed. Porto Alegre: UFRGS, **2002**. 120p.
- Phillips, C.A.; Laird, K.; Allen, S.C., **2012**. The use of Citri-V™® — An antimicrobial citrus essential oil vapour for the control of *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* and *Alternaria alternata* in vitro and on food. Food Res. Int. 47, 310-314.
- Ranilla, L.G.; Kwon, Y.; Apostolidis, E.; Shetty, K., **2010**. Phenolic compounds, antioxidant activity and *in vitro* inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. Bioresour. Techn. 101, 4676-4689.
- Ramachandran, E.; Thomas, S.P.; Poornima, P.; Kalaivani, P.; Prabhakaran, R.; Padma, V.V.; Natarajan, K., **2012**. Evaluation of DNA binding, antioxidant and cytotoxic activity of mononuclear Co(III) complexes of 2-oxo-1,2-dihydrobenzo[h]quinoline-3-carbaldehyde thiosemicarbazones. E. J. Med. Chem. 50, 405-415.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., **1999**. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cat ion decolorization assay. Free Radical Biol. Med. 26, 1231-1237.
- Rodriguez, M.V.; Gattuso, S.; Gattuso, M., **2008**. *Baccharis crispa* y *Baccharis trimera* (Asteraceae): Revisión y nuevos Aportes para su Normalización Micrográfica. Lat. Am. J. Pharm. 27, 387-395.
- Robbers, J.E.; Speedie, M.K.; Tyler, V.E. Farmacognosia e Farmacobiotecnologia. 1^a ed. São Paulo: Premier, **1997**. 372p.
- Robbers, C.K.; Sindhu, K.K., **2009**. Oxidative stress and metabolic syndrome. Life Sciences. 84, 705-712.
- Salueiro, L.; Gonçalves, M.J.; Tavares, A.C.; Cavaleiro, C.; Cruz, M.T.; Lopes, M.C.; Canhoto, J., **2012**. Composition, antifungal activity and cytotoxicity of the essential

- oils of *Seseli tortuosum* L. and *Seseli montanum* subsc. *peixotoanum* (Samp.) M. Laínz from Portugal. *Ind Crop Prod.* 39, 204-209.
- Sassa, S., **1982**. Delta-Aminolevulinic-Acid Dehydratase Assay. *Enzyme*. 28, 133-143.
- Siddhuraju, P., Nithiyanantham, S., Francis, G., **2013**. A promising approach to enhance the total phenolic content and antioxidant activity of raw and processed *Jatropha curcas* L. Kernel meal extracts. *Ind. Crops Prod.* 43, 261-269.
- Singh, H.P., Batish, D.R., Arora, K., Kohli, R.K., **2007**. Potential utilization of dried powder of *Tagetes minuta* as a natural herbicide for managing rice weeds. *Crop Prot.* 26, 566-571.
- Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 4^a ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, **2002**. 824p.
- Smirnoff, N., Cumbes, Q., **1989**. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*. 28, 1057-1060.
- Souza, C.A.S., Avancini, C.A.M., Wiest, J.M., **2000**. Antimicrobial activity of *Tagetes minuta* L. – *Compositae* (Chinchilho) against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 37, 14-25.
- Stratil, P., Klejdus, B., Kuban, V., **2006**. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables – evaluation of spectrophotometric methods. *J. Agric. Food Chem.* 54, 607-616.
- Upadhyaya, K., Chanotiya, C.S., Padalia, R., Bhatt, Z.A., Bahuguna, Y.M., **2010**. Comparative phytochemistry and pharmacological evaluation of *Tagetes minuta*. *J. Pharm. Res.* 3, 1434-1437.
- Victoria, F.N., Lenardão, E.J., Savegnago, L., Perin, G., Jacob, R.G., Alves, D., Silva, W.P., Motta, A.S., Nascente, P.S., **2012**. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. *Food Chem. Toxicol.* 50, 2668-2674.
- Villarreal, M.L.; Alvarezb, L.; Alonsoa, D.; Navarroa, V.; Garciac, P.; Delgadoc, G., **1994**. Cytotoxic and antimicrobial screening of selected terpenóides from Asteraceae species. *J. Ethnopharmacol.* 42, 25-29.
- Vittori, S.; Maggi, F.; Bramucci, M.; Cecchini, C.; Coman, M.M.; Cresci, A.; Cristalli, G.; Lupidi, G.; Papa, F.; Quassinti, L.; Sagratini, G., **2009**. Composition and

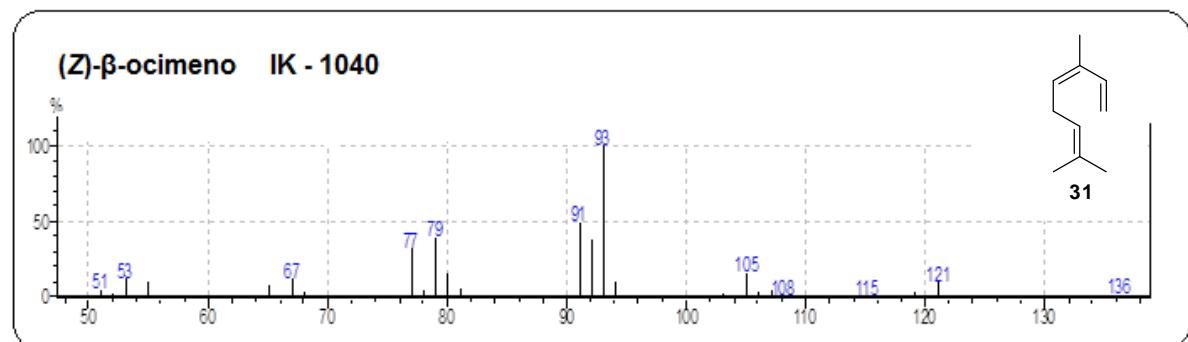
- biological activity of essential oil of *Achillea ligustica* All. (Asteraceae) naturalized in central Italy: Ideal candidate for anti-cariogenic formulations. *Fitoterapia*, 80, 313-319.
- Yen, G.C., Lai, H.H., Chou, H.Y., **2001**. Nitric oxide – Scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root. *Food Chem.* 74, 471-478.
- Yin, H., 2008. New techniques to detect oxidative stress markers: mass spectrometry based methods to detect isoprostanes as the gold standard for oxidative stress in vivo. *BioFactors*. 34, 109-124.
- Yu, J., Lei, J., Zhang, X., Yu, H., Tian, D., Liao, Z., Zou, G., **2011**. Anticancer, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Lycopus lucidus* Turcz. Var. *hirtus* Regel. *Food Chem.* 126, 1593-1598.
- Zygadlo, J.A.; Guzman, C.A.; Grosso, N.R., **1995**. Antifungal properties of the leaf oils of *Tagetes minuta* and *T. filifolia* Lag. *J. Essent. Oil Res.* 6, 617-621.
- Zygadlo, J.A., Scrivanti, L.R., Zunino, M.P., **2003**. *Tagetes minuta* and *Schinus areira* essential oils as allelopathic agents. *Biochem. System. Ecol.* 31, 563-572.

Capítulo 4

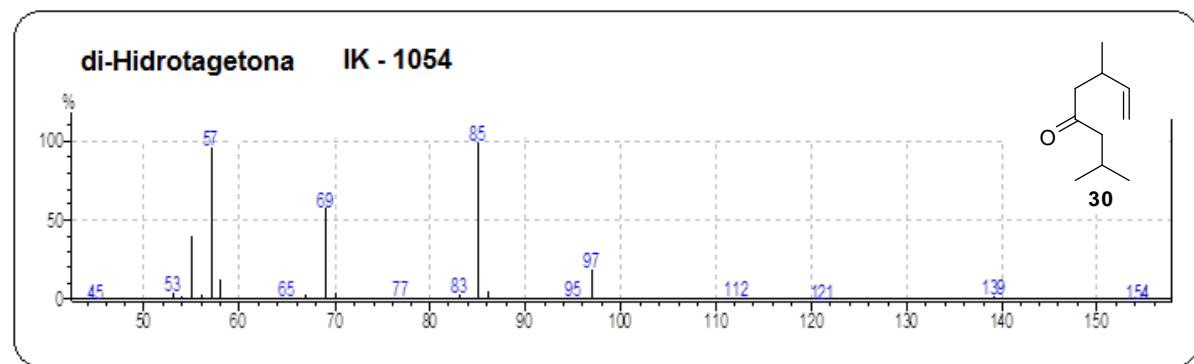
Espectros Seleccionados



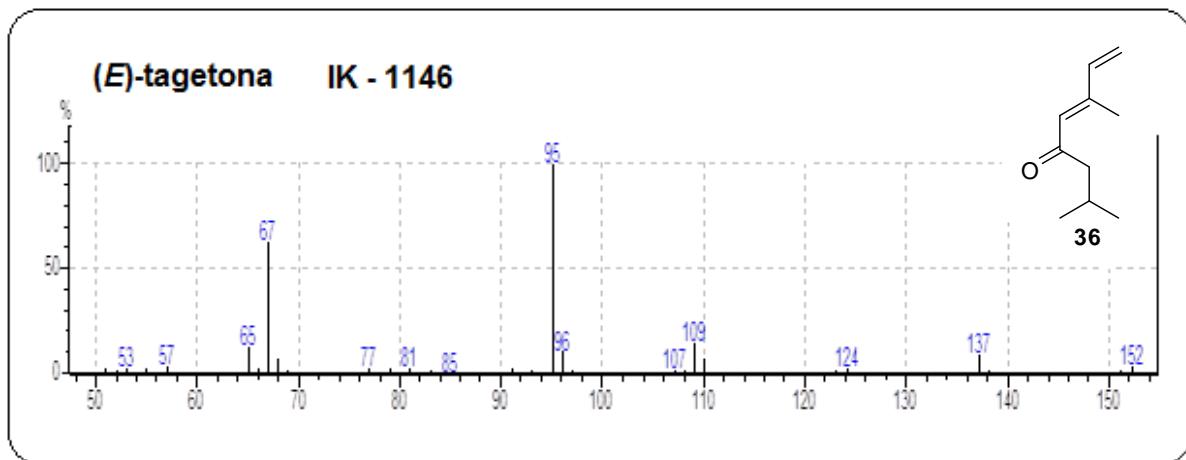
Espectro de massas de baixa resolução do limoneno **34** presente no óleo essencial das flores e folhas de *T. minuta*.



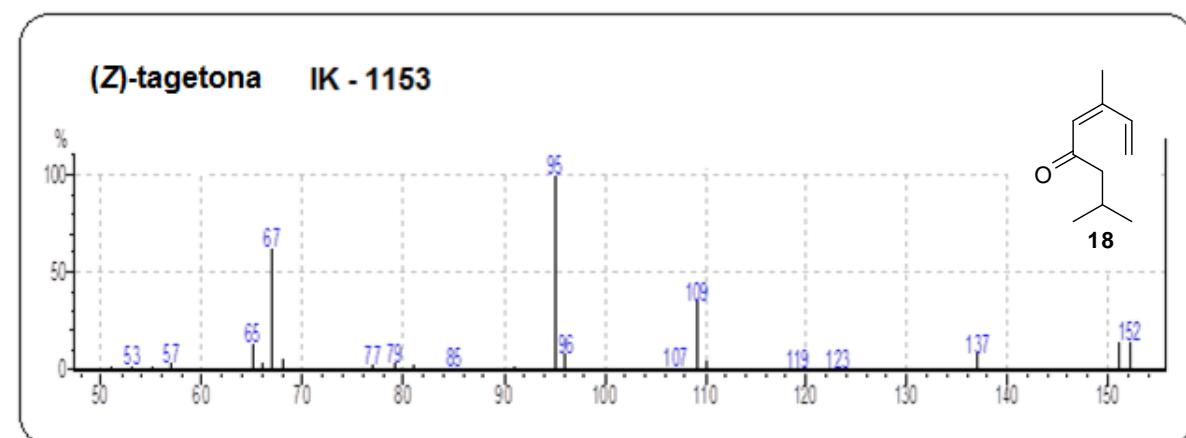
Espectro de massas de baixa resolução do (Z)- β -ocimeno **31** presente no óleo essencial das flores e folhas de *T. minuta*.



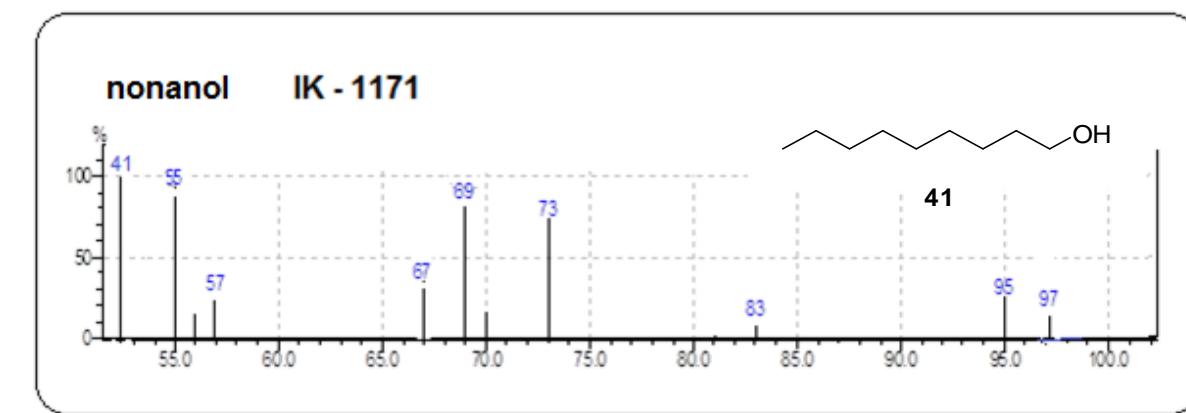
Espectro de massas de baixa resolução da di-hidrotagetona **30** presente no óleo essencial das flores e folhas (majoritário) de *T. minuta*.



Espectro de massas de baixa resolução da (E)-Tagetona **36** presente no óleo essencial das flores e folhas de *T. minuta*.

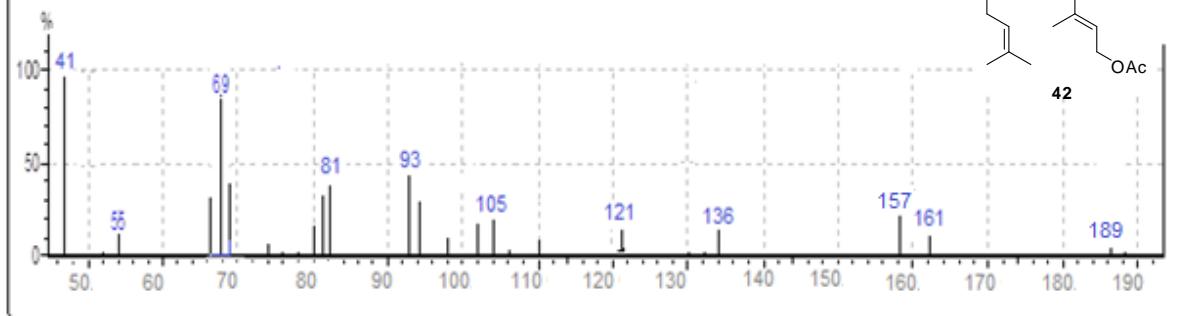


Espectro de massas de baixa resolução da (Z)-Tagetona **18** presente no óleo essencial das flores (majoritário) e folhas de *T. minuta*.



Espectro de massas de baixa resolução do nonanol **41** presente no óleo essencial das flores e folhas de *T. minuta*.

(E,E)-acetato de farmesil IK - 1843



Espectro de massas de baixa resolução do (*E, E*)-Acetato de Farmesil **42** presente no óleo essencial das folhas de *T. minuta*.

Apêndices

Apêndice A – Estruturas de Terpenos

