



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE  
SANTANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS  
GENÉTICOS VEGETAIS**



**GABRIELA CARINHANHA SILVA**

**ELICITORES NA PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO E AÇÃO  
BIOLÓGICA DE METABÓLITOS DE *Lippia origanoides*  
KUNTH (VERBENACEAE)**

**Feira de Santana – BA**

**2017**

**GABRIELA CARINHANHA SILVA**

**ELICITORES NA PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO E AÇÃO  
BIOLÓGICA DE METABÓLITOS DE *Lippia origanoides*  
KUNTH (VERBENACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Angélica Maria Lucchese  
Co-orientador: Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira  
Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marilene Lopes da Rocha

**Feira de Santana – BA**

**2017**

**Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado**

S58e Silva, Gabriela Carinhanha  
Elicitores na produção, composição e ação biológica de metabólitos de  
*Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) / Gabriela Carinhanha Silva. –  
2017.

113 f.: il.

Orientadora: Angélica Maria Lucchese.

Coorientador: Lenaldo Muniz de Oliveira.


Coorientadora: Marilene Lopes da Rocha.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana,  
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2017.


1. *Lippia origanoides*. 2. Metabólitos – Produção. 3. Alecrim de tabuleiro.  
I. Lucchese, Angélica Maria, orient. II. Oliveira, Lenaldo Muniz de, coorient.  
III. Rocha, Marilene, Lopes da, coorient. IV. Universidade Estadual de Feira  
de Santana. V. Título.

CDU: 582.949.1

**BANCA EXAMINADORA**

  
**Profa. Dra. Lourdes Cardoso de Souza Neta**  
(Universidade do Estado da Bahia - UNEB)

  
**Profa. Dra. Francieli da Silva**  
(Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB)

  
**Profa. Dra. Jacqueline Miranda Gonçalves**  
(Faculdade Regional da Bahia - UNIRB)

  
**Profa. Dra. Fernanda Pinheiro de Carvalho Ribeiro**  
(Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana - UNEF)

  
**Profa. Dra. Angélica Maria Lucchese**  
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)  
Orientadora e Presidente da Banca

**Feira de Santana – BA  
2017**

## AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo.

À minha mãe, por ser minha confidente, minha fortaleza e fonte de consolo e amor ilimitada.

A meu pai e minhas irmãs, pelo amor imenso, cuidado e apoio sempre.

A Felipe, meu marido, por cuidar de mim com amor diariamente, ajudar e incentivar.

À minha orientadora, Angélica, por ter aceitado me orientar, com amabilidade e afeição, e ter me permitido absorver um pouquinho de todo seu conhecimento.

A Lenaldo, meu co-orientador, por ter me acolhido, ensinado e permitido trilhar a maior parte do meu caminho na pesquisa até aqui.

A Marilene Lopes da Rocha pela co-orientação.

A todos os membros da família Lapron, pela convivência maravilhosa e ajuda mútua, principalmente, a Édna, Jadinha, Serlinha, Ingrid, Iza, Horácio, Lari Mimaes e Adri, pela valiosa ajuda. E Júlia que, apesar de ter ficado pouco tempo como minha IC, foi de grande ajuda.

À professora Ana Cristina Fermino Soares, da UFRB, pela concessão dos fungos.

Caroline Damasceno pela fundamental contribuição.

Aos professores da UEFS, Valéria Souza Freitas, Ynara Bosco de Oliveira Lima Arsati, Tarsila Morais de Freitas, Maurício Santana Lordelo, Marilza Neves do Nascimento, Hugo Neves Brandão, Claudineia Regina Pelacani Cruz, Ângelo Amancio Duarte, Germano Guedes, José Carlos O. de Jesus, José Raniere F. de Santana, pelo suporte.

A UEFS e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais pela oportunidade, suporte e infraestrutura.

À Fapesb, pela concessão da bolsa de doutorado.

A Fapesb, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

A Nati e Thais pela ajuda.

Aos funcionários terceirizados do Horto e do Labexa pela ajuda.

“Herb the gift from the Earth and what's from the Earth is of the greatest worth.”

(Ben Harper)

## RESUMO

*Lippia origanoides*, arbusto aromático medicinal nativo, possui ampla gama de atividades biológicas, como antioxidante e antimicrobiana. A elicitação, estimulação da defesa vegetal, visa aumentar a produção compostos ativos. Assim, objetivou-se investigar a produção, composição e atividades antimicrobiana, antioxidante e fotoprotetora de metabólitos desta espécie sob elicitação. Plantas cultivadas foram pulverizadas com suspensões de material celular de *Aspergillus niger* (AN) e *Fusarium oxysporum* (FO), solução de peróxido de hidrogênio (SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e água destilada. Óleos essenciais (OE's) hidrodestilados de folhas (OEF) e de inflorescências (OEI) foram quantificados, analisados por CG/EM e testados contra micro-organismos em microdiluição em caldo. Os teores de fenólicos, equivalentes a ácido gálico, e flavonoides totais, equivalentes a quercetina, e Atividade de Sequestro de Radical Livre DPPH• (ASRL) de extratos metanólicos (EM) de folhas, inflorescências, caule e raiz foram mensurados por espectrofotômetro. Obteve-se o Fator de Proteção Solar *in vitro* (FPS) e a razão UVA/UVB dos EM's por espectrofotômetro e de formulações fotoprotetoras (FFP's) contendo o extrato mais ativo. SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentou a produção de OEI. FO elevou a concentração de biclogermacreno no OEI. Todos os elicitores aumentaram a eficiência dos OE's contra *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* e reduziram contra *Escherichia coli*. FO e SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduziram os fenólicos nos EM's de caule e raiz. FO reduziu os flavonoides do ME da raiz. A ASRL do EM do caule aumentou com FO e do EM da raiz reduziu com SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e AN. SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentou o FPS do EM de caule e inflorescências. O EM de inflorescências tratadas com SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentou o FPS e a razão UVA/UVB de FFP's contendo ativos sintéticos. Conclui-se que FO e SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> possuem potencial como elicitores da produção de compostos ativos em *L. origanoides*.

**Palavras-chave:** Alecrim-de-tabuleiro. Estimulação da defesa vegetal. Produção de metabólitos ativos. Antimicrobiano. Antioxidante. Fotoproteção.

## ABSTRACT

*Lippia origanoides*, native medicinal aromatic shrub, has broad range of biologic activities. Elicitation, stimulation of plant defense, aims to rise the pruction of active compounds. Thus, it aimed to investigate the production, composition and activity of metabolites from this specie under elicitation. Cultivated plants were sprayed with cell material suspension of *Aspergillus niger* (AN) and *Fusarium oxysporum* (FO), solution of hydrogen peroxide (SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), and distilled water. Hydrodistilled essential oils (EO) from leaves (LEO) and from inflorescences (IEO) were quantified, analyzed by GC/MS and tested against microorganisms by broth microdilution. The content of total phenolics calculated as gallic acid equivalent and flavonoids calculated as quercetin equivalent, and free radical scavenging activity (FRSA) using DPPH• of methanolic extracts (ME) of the leaves, inflorescences, stem and root were measured by spectrophotometer. It was calculated the *in vitro* solar protection factor (SPF) of ME and of photoprotective formulations (PPF) with the more active extract by spectrophotometer. SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increased the IEO production. FO increased the bicyclogermacrene concentration on IEO. All elicitors increase the effectiveness of both EO against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*, and to reduce the activity against *Escherichia coli* of these one. FO and SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduced the phenolic compounds on ME of stem and root. FO reduced the content of flavonoids on ME of the root. FO increased the FRSA of ME of stem. SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and AN reduced the FRSA of ME of root. SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increased the SPF of ME of stem and inflorescence. The ME of inflorescence treated with SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> raised the SPF of PPF containing synthetic active compounds. It is concluded that FO and SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> have potentiality as elicitors of *L. origanoides* active compounds production.

**Key words:** Mexican oregano. Plant defense stimulation. Production of active metabolites. Antimicrobial. Antioxidant. Photoprotection



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - <i>Lippia origanoides</i> K.; A – ramo; B – inflorescência; C – Inflorescências e folhas; D – Planta inteira. ....	18
Figura 1.2 - <i>Lippia origanoides</i> : A/A' - Aspectos gerais da planta; B- Inflorescência; C- Bráctea floral; D- Tricomas pubescentes da bráctea; E- Superfície adaxial da folha; F- Tricomas pubescentes da superfície abaxial da folha; G- Tricomas pubescentes da superfície adaxial da folha; H- Distribuição geográfica. Prancha e legenda obtidas de O'Leary et al. (2012). ....	19
Figura 2.1- Esquema experimental. ....	42
Figura 2.2- Culturas de <i>Fusarium oxysporum</i> (A) e <i>Aspergillus niger</i> (B) utilizadas. ....	44
Figura 2.3- Amostras de óleo essencial de folhas (A) e inflorescências (B) de <i>L. origanoides</i> sob diferentes tratamentos. ....	47
Figura 2.4- Esquema do teste de sensibilidade microbiana por microdiluição em caldo. ....	49
Figura 2.5- Microplaca do teste de sensibilidade microbiana após revelação com resazurina (A) e placa de Petri inoculada com os conteúdos dos poços que permaneceram de cor azul. ....	50
Figura 2.6- Precusores e componentes dos óleos essenciais de <i>L. origanoides</i> . Adaptado de Dewick, (2002) e Hyldgaard et al. (2012). ....	54
Figura 2.7- Concentração média dos componentes dos óleos essenciais de folhas e inflorescências de <i>L. origanoides</i> . *Médias não diferem entre os órgãos segundo o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). ....	57
Figura 2.8- Concentração relativa (%) de biciclogermacreno no óleo essencial das inflorescências de plantas de <i>L. origanoides</i> pulverizadas com material celular de <i>Aspergillus niger</i> (AN) e <i>Fusarium oxysporum</i> (FO), solução de peróxido de hidrogênio (SH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) e água destilada (CT). *Média difere do CT segundo o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). ....	58
Figura 3.1- Esquema experimental. ....	71
Figura 3.2- Curva de calibração do padrão utilizado na determinação do teor de compostos fenólicos totais Equivalentes a Ácido Gálico (EAG). ....	74
Figura 3.3- Curva de calibração do padrão utilizado na determinação do teor de flavonoides totais Equivalentes a Quercetina (EQ). ....	75
Figura 3.4- Espectros de absorção eletromagnética do DPPH• e do DPPH-H e a reação de redução por um agente antioxidante (AO-H). Imagem adaptada de Boligon et al. (2014). ....	76
Figura 3.5- Distribuição das diferentes diluições da amostra (D1 a D11) de extrato metanólico, em microplaca de 96 poços no teste de sequestro de radical DPPH•. R1, R2 e R3: repetições; A+M: 60 µL de amostra + 120 µL de metanol; A+D: 60 µL de amostra + 120 µL de solução de DPPH•; Branco: 180 µL de metanol. ....	77
Figura 3.6- Modelo de curva de porcentagem de sequestro de radical livre (SRL) de DPPH• em função da concentração de amostra antioxidante. ....	78
Figura 3.7- Áreas de absorção de um protetor solar na faixa de comprimento de onda ( $\lambda$ ) do UVB e do UVA calculadas para a determinação da Razão UVA/UVB. ....	80
Figura 3.8- Compostos fotoprotetores comerciais utilizados (GUARANI et al., 2009). ....	82

Figura 3.9- Correlação entre as médias de teor de compostos fenólicos totais Equivalentes a Ácido Gálico (EAG) e de flavonoides totais Equivalentes a Quercetina (EQ) e as médias da Concentração de feficiência média (CE50) dos extratos de <i>L. origanoides</i> sob elicitação.....	90
Figura 3.10- Influência de diferenças moleculares entre flavonoides sobre sua capacidade antioxidante equivalente ao 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox). Imagem modificada a partir de Rice-Evans et al. (1996).....	92
Figura 3.11- Espectro de absorção no UV dos extratos metanólicos de <i>L. origanoides</i> Kunth (grupo CT).....	93
Figura 3.12- Espectro de radiação eletromagnética (INSTITUTO DE FÍSICA, 2017).....	94
Figura 3.13- Espectro de absorção no UV dos extratos metanólicos de <i>L. origanoides</i> sob elicitação. AN: <i>Aspergillus niger</i> ; FO: <i>Fusarium oxysporum</i> ; SH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : peróxido de hidrogênio; CT: controle (água destilada). ....	95
Figura 3.14- Correlação entre a razão UVA/UVB e o teor de flavonoides totais Equivalentes a Quercetina (EQ) dos extratos metanólicos do caule de <i>L. origanoides</i> sob elicitação. R <sup>2</sup> : coeficiente de explicação; r: coeficiente de correlação; *Significativo pelo teste t de Student (p < 0,05).....	97
Figura 3.15- Fator de proteção solar (FPS) <i>in vitro</i> dos extratos metanólicos de <i>L. origanoides</i> sob elicitação (soluções a 100 mg/L). *Médias diferem do CT, segundo teste Tukey (p < 0,05). AN: <i>Aspergillus niger</i> ; FO: <i>Fusarium oxysporum</i> ; SH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : peróxido de hidrogênio; CT: controle (água destilada).....	98
Figura 3.16- Fator de Proteção Solar (FPS) <i>in vitro</i> dos extratos metanólicos de <i>L. origanoides</i> em função da concentração (grupo CT). ....	98
Figura 3.17-Espectro de absorção no UV da formulação fotoprotetora contendo 10% de extrato metanólico de inflorescência de <i>L. origanoides</i> elicitada com peróxido de hidrogênio (0,5 M) em base O/A (oleosa/aquosa). ....	100
Figura 3.18- Espectro de absorção no UV de formulações fotoprotetoras (FFP) a 0,2 mg/mL contendo benzofenona a 3,5%, metoxicinamato de octila a 7% e/ou extrato metanólico de inflorescência de <i>L. origanoides</i> a 10% elicitada com peróxido de hidrogênio a 0,5 M (SH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ). ....	101
Figura 3.19- Fator de proteção solar <i>in vitro</i> de formulação fotoprotetora contendo 10% de extrato metanólico de inflorescência de <i>L. origanoides</i> sob elicitação com peróxido de hidrogênio em base O/A (oleosa/aquosa).....	102

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1- Rendimento e porcentagem de óleo essencial de folhas e inflorescências de <i>L. origanoides</i> submetida a pulverizações foliares com elicitores. ....	51
Tabela 2.2- Composição do óleo essencial (%) de folhas de <i>L. origanoides</i> submetidas a pulverização com suspensão de material celular de <i>Aspergillus niger</i> (AN) e <i>Fusarium oxysporum</i> (FO), solução de peróxido de hidrogênio (SH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) e água destilada (CT).....	55
Tabela 2.3- Composição do óleo essencial (%) de inflorescências de <i>L. origanoides</i> submetidas a pulverização com suspensão de material celular de <i>Aspergillus niger</i> (AN) e <i>Fusarium oxysporum</i> (FO), solução de peróxido de hidrogênio (SH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) e água destilada (CT).....	56
Tabela 2.4- Médias das concentrações inibitória mínima (CIM), bactericida mínima (CBM) e fungicida mínima (CFM) dos óleos essenciais de <i>L. origanoides</i> (µL/mL) sob elicitação, frente a diferentes micro-organismos.....	60
Tabela 3.1- Proporção de solvente por massa de droga vegetal utilizada por ciclo de extração, média e desvio padrão do teor de umidade da droga vegetal e de rendimento de extrato metanólico por órgão de plantas de <i>L. origanoides</i> .....	73
Tabela 3.2- Teor de fenólicos totais no extrato metanólico de <i>L. origanoides</i> sob elicitação (mg EAG/g).....	84
Tabela 3.3- Teor de flavonoides totais na matéria seca de <i>L. origanoides</i> pulverizada com diferentes elicitores, analisada a partir do extrato metanólicos, expesso em mg EQ/g. ....	87
Tabela 3.4- Atividade de sequestro de radical livre DPPH• (%SRL) do extrato metanólico de <i>L. origanoides</i> pulverizada com diferentes elicitores.....	89
Tabela 3.5- Razão UVA/UVB dos extratos metanólicos de <i>L. origanoides</i> sob elicitação. ....	96
Tabela 3.6- Fator de proteção solar (FPS) <i>in vitro</i> e Razão UVA/UVB de formulações fotoprotetoras (FFP) em base O/A.....	103

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1- Listas de sinônimos de <i>Lippia origanoides</i> Kunth.....	17
Quadro 2.1- Micro-organismos utilizados no experimento.....	46
Quadro 3.1- Valores das constantes $EE(\lambda) \times I(\lambda)$ previamente determinadas para o cálculo do FPS (SAYRE et al., 1979).....	79
Quadro 3.2- Sistema Boots's Star Rating relacionado com a razão UVA/UVB conforme Revised Guidelines to the Practical Measurement of UVA (2004) (Levy, 2007; Boots the Chemists, 2004).*	80
Quadro 3.3- Composição da base A/O .....	81
Quadro 3.4- Composição quali-quantitativa das formulações fotoprotetoras produzidas a partir do extrato de <i>L. origanoides</i> selecionado e de FFP's contendo compostos fotoprotetores comerciais (g). .....	82
Quadro 3.5- Influência da dosagem no FPS-UVB. ....	102

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	13
<b>1 CAPÍTULO: REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
1.1 O gênero <i>Lippia</i> Linn.....	15
1.2 <i>Lippia origanoides</i> Kunth.....	16
1.2.1 Características morfológicas.....	17
<b>1.2.2 Usos etnobotânicos</b> .....	20
<b>1.2.3 Atividades biológicas</b> .....	21
<b>1.2.4 Composição química</b> .....	23
1.3 Variação química e atividade biológica de plantas medicinais .....	26
1.4 Fatores que influenciam no conteúdo de metabólitos secundários.....	28
1.5 Respostas de defesa em plantas e ativação do metabolismo secundário .....	30
1.6 Elicitação e produção de metabólitos secundários de interesse.....	32
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	35
<b>2 CAPÍTULO: COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Lippia origanoides</i> SOB ELICITAÇÃO</b> .....	39
2.1 INTRODUÇÃO.....	40
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
<b>2.2.1 Propagação das plantas de <i>L. origanoides</i></b> .....	43
<b>2.2.2 Cultivo das plantas em campo</b> .....	43
<b>2.2.3 Produção das suspensões elicitoras de material celular de fungos</b> .....	43
<b>2.2.4 Aplicação dos tratamentos e colheita das plantas do campo</b> .....	44
<b>2.2.5 Obtenção dos óleos essenciais</b> .....	45
<b>2.2.6 Análise dos componentes dos óleos essenciais</b> .....	45
<b>2.2.7 Determinação das concentrações inibitória e microbicida mínimas</b> .....	46
<b>2.2.8 Análise estatística</b> .....	50
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
<b>2.3.1 Produção de óleo essencial</b> .....	51
<b>2.3.2 Análise da composição dos óleos essenciais</b> .....	53
<b>2.3.3 Teste de sensibilidade microbiana por microdiluição em caldo</b> .....	59
2.4 CONCLUSÕES .....	63
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	64
<b>3 CAPÍTULO: ELICITAÇÃO DE PLANTAS DE <i>Lippia origanoides</i> KUNTH CULTIVADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO</b> .....	68
3.1 INTRODUÇÃO.....	69
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	71

<b>3.2.1 Propagação e cultivo das plantas</b> .....	71
<b>3.2.2 Preparo e aplicação dos elicitores</b> .....	72
<b>3.2.3 Obtenção dos extratos metanólicos</b> .....	73
<b>3.2.4 Teor de fenólicos totais dos extratos</b> .....	73
<b>3.2.5 Teor de flavonoides totais dos extratos</b> .....	74
<b>3.2.6 Atividade antioxidante dos extratos metanólicos</b> .....	75
<b>3.2.7 Atividade fotoprotetora</b> .....	78
3.2.7.1 Espectro de absorbância UV dos extratos metanólicos .....	78
3.2.7.2 Fator de Proteção Solar <i>in vitro</i> e razão UVA/UVB.....	78
3.2.7.3 Formulações fotoprotetoras (FFP's) .....	80
3.2.7.4 Obtenção da base A/O .....	81
3.2.7.5 Preparo das FFP's .....	82
3.2.7.6 Fator de proteção solar <i>in vitro</i> e razão UVA/UVB das FFP's.....	83
<b>3.2.8 Análise estatística</b> .....	83
<b>3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	84
<b>3.3.1 Teor de fenólicos totais dos extratos</b> .....	84
<b>3.3.2 Teor de flavonoides totais dos extratos metanólicos</b> .....	86
<b>3.3.3 Atividade antioxidante dos extratos metanólicos</b> .....	88
<b>3.3.4 Atividade fotoprotetora</b> .....	92
3.3.4.1 Espectro de absorção no UV dos extratos metanólicos .....	92
3.3.4.2 Fator de Proteção Solar <i>in vitro</i> dos extratos metanólicos.....	97
3.3.4.3 Espectro de absorção no UV e fator de proteção solar das FFP's .....	99
<b>3.4 CONCLUSÕES</b> .....	105
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	106
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	109
<b>APÊNDICES</b> .....	111

## INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil, apesar de possuir uma das maiores biodiversidades do mundo, apresenta pouco desenvolvimento de pesquisas destinadas a identificação, padronização e prospecção de seus recursos genéticos vegetais com aplicação terapêutica. O investimento insuficiente de recursos e a consequente carência de políticas públicas efetivas de promoção do desenvolvimento das ciências no país mostra-se como empecilho para a exploração e valorização das riquezas vegetais nacionais, as quais são potencial fonte de renda para classes menos favorecidas da sociedade, principalmente da zona rural (CASTRO & ALBIERO, 2016).

Entre as espécies vegetais nativas de importância terapêutica destaca-se *Lippia origanoides* Kunth, Verbenaceae, um arbusto aromático com ampla distribuição geográfica nas zonas tropicais e subtropicais, de maior abundância nas Américas do Sul e Central. Espécie tipicamente de climas quentes, integra a vegetação tanto do bioma Amazônia, caracterizado por clima com elevado e regular índice pluviométrico, quanto dos biomas Cerrado e Caatinga, com climas mais áridos e chuvas irregulares ao longo do ano. Ademais, *L. origanoides* ocorre desde locais com altitude próxima ao nível do mar até acima de dois mil metros de elevação (O'LEARY et al, 2012).

Devido a grande amplitude geográfica, a espécie recebeu várias sinonímias botânicas e nomenclaturas populares, entre elas alecrim-da-chapada, alecrim-de-tabuleiro e alecrim-pimenta (SIMÕES et al., 2015). Com importância na medicina tradicional, suas folhas e inflorescências são utilizadas em países dos continentes americano, africano e europeu principalmente em decocções e infusões no tratamento de disfunções gastrointestinais e de problemas respiratórios. *L. origanoides* é ainda consumida no combate a problemas relacionados à saúde da mulher, bem como a diabetes, inflamações, infecções, febre e dores. Em experimentos científicos, tem-se demonstrado atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, antinocicepitiva, anticancerígena, inseticida, carrapaticida, etc., de seus extratos, óleo essencial e/ou compostos isolados (OLIVEIRA et al., 2014; PASCUAL et al, 2001).

Seus usos populares e suas propriedades farmacológicas revelam a importância da espécie como tratamento alternativo para problemas de saúde em regiões onde o acesso à medicina convencional é limitado. Além disso, *L. origanoides* mostra-se um importante recurso genético da flora brasileira com potencialidade de prospecção, principalmente pelo setor farmacêutico. Entretanto, a espécie apresenta variação na composição química e na eficiência de algumas de suas atividades biológicas quando comparados trabalhos da literatura científica, o que dificulta sua padronização comercial.

Os princípios ativos estão entre os componentes químicos com variação na espécie. Produtos do metabolismo secundário vegetal, esses compostos apresentam função adaptativa, representando uma reação da planta às condições do ambiente. Além da carga hereditária determinada pela história evolutiva da espécie e da fase do desenvolvimento, a ação de agentes externos pode desencadear processos fisiológicos, que ativam ou alteram a síntese de compostos ativos ou de classes de compostos. Vários metabólitos secundários vêm sendo associados a respostas de defesa ao ataque de animais herbívoros ou parasitas e a infecção por micro-organismos fitopatogênicos em plantas (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Um método para investigar a interferência ambiental na produção de metabólitos secundários é a aplicação de elicitores, agentes que estimulam o metabolismo de defesa em plantas. Para tanto, substâncias provenientes de organismos agressores e sinalizadoras das cascatas bioquímicas de defesa vegetal podem ser utilizadas como elicitores (ZHAO et al., 2005). Esta ferramenta pode ser útil em cultivos de plantas medicinais como forma de incrementar a produtividade dos princípios ativos e garantir a qualidade da matéria prima produzida.

Diante do potencial prospectivo e da carência de informações acerca da interferência ambiental na produção de substâncias ativas de *L. origanoides*, faz-se necessário investigar e identificar fatores que estimulam a síntese desses compostos na planta. Com base nessas informações, é possível o estabelecimento de protocolos visando padronizar seu cultivo e viabilizar sua utilização na produção de medicamentos e para que sejam promovidas maiores segurança e eficácia no seu uso na medicina tradicional.

Portanto, o presente trabalho objetivou investigar a produção de metabólitos secundários e a atividade biológica de plantas cultivadas de *L. origanoides* submetidas a agentes elicitores de resposta de defesa. Para isso, realizou-se a análise da composição química e da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de folhas e inflorescências e a comparação dos teores de fenólicos e flavonoides totais, das atividades antioxidante e fotoprotetora de folhas, inflorescências, caule e raiz. Além disso, avaliou-se a ação fotoprotetora e/ou como adjuvante do extrato metanólico mais promissor em formulações fotoprotetoras.



## 1 CAPÍTULO: REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 O gênero *Lippia* Linn.

O gênero *Lippia* L., um dos maiores representantes da família Verbenaceae, é composto por 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores distribuídas principalmente na zona intertropical do planeta, em países das Américas do Sul e Central e da África (JUDD & LUCHSINGER, 2007) e na Austrália (MUNIR, 1993). O Brasil é um importante centro de dispersão deste gênero onde são encontradas em torno de 98 espécies com alta taxa de endemismo, das quais nove estão na lista de espécies ameaçadas de extinção por sua pequena extensão de ocorrência e pela elevada ação antrópica nesses locais (SALIMENA et al. 2013). Das espécies nativas, 35 são encontradas no semiárido brasileiro (GIULIETTI et al., 2006), dentre elas estão *Lippia alba*, *Lippia dulcis*, *Lippia thymoides* e *L. organoides*.

Várias espécies do gênero são utilizadas na medicina popular de países americanos, africanos e alguns países europeus, principalmente no tratamento de doenças gastrointestinais e respiratórias. As partes mais utilizadas são as folhas e flores, bem como toda a parte aérea, sendo consumidas geralmente na forma de decocto e infuso por via oral. Entre as espécies mais utilizadas na medicina tradicional estão *L. alba*, *Lippia geminata*, *L. organoides* e *Lippia nodiflora*. O gênero apresenta amplo espectro de utilização terapêutica, abrangendo problemas de saúde dos sistemas digestório, respiratório, circulatório, nervoso, musculoesquelético, endócrino e genitais, além de doenças infecciosas, de pele, câncer, entre outras. Certamente, seus usos são uma indicação de grande variedade de princípios ativos nas espécies do gênero. Algumas espécies têm, ainda, fins alimentícios como temperos, chás e aromatizante de bebidas (SANTOS et al., 2015; PASCUAL et al., 2001).

As propriedades de espécies de *Lippia* têm sido estudadas em diferentes âmbitos, sendo a maioria dos trabalhos relacionados a interesses farmacológicos. Ensaio pré-clínicos e clínicos vêm confirmando as atividades antibacteriana, antifúngica, antiprotozoário, antiviral, inseticida e/ou repelente, escabicida, antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, sedativa, entre outras (PASCUAL et al., 2001).

As classes de compostos orgânicos mais frequentemente encontradas e mais amplamente distribuídas no gênero são os terpenos e os compostos fenólicos. O gênero *Lippia* é caracterizado por um grande número de espécies aromáticas produtoras de terpenos voláteis, mono e sesquiterpenos, componentes principais dos óleos essenciais aos quais vêm sendo atribuída parte das propriedades biológicas observadas nestas plantas. Os terpenos mais

amplamente encontrados nos óleos essenciais deste gênero são limoneno,  $\beta$ -cariofileno, *p*-cimeno, cânfora, linaool,  $\alpha$ -pineno e timol. Os compostos fenólicos são largamente encontrados em extratos de plantas, porém, em algumas espécies de *Lippia* as concentrações de fenólicos totais têm se mostrado elevadas, provavelmente, estando relacionadas à atividade antioxidante citada anteriormente (OMBITO et al., 2014). Além das classes citadas acima, foi constatada a presença de taninos, iridoides, alcaloides, resinas, açúcares, naftoquinonas, saponinas, esteroides, carotenoides, entre outras. Muitas destas substâncias estão relacionadas com propriedades biológicas e algumas têm relevância quimiotaxonômica, como por exemplo iridoides glicosídicos (PASCUAL et al., 2001).

## 1.2 *Lippia origanoides* Kunth

*Lippia origanoides* é um arbusto aromático que cresce em solos rochosos, em área de caatinga e cerrado, encontrado desde 160 m a 2500 m acima do nível do mar. Esta espécie apresenta-se bem distribuída pela América do Sul e Central (Figura 1.2H), principalmente em países como Brasil, Bolívia, Colômbia, Guiana, Paraguai e norte na Argentina, ocorrendo também na Costa Rica, Venezuela e México, estendendo-se até a região árida do sul dos Estados Unidos, no estado do Texas (O'LEARY et al., 2012).

Por ter ampla distribuição, *L. origanoides* apresenta um grande número de sinônimos e de nomes populares. Os nomes populares mais comuns são alecrim-de-tabuleiro (SANTOS et al., 2002), alecrim-do-nordeste, alecrim-bravo (SANTOS et al., 2015), alecrim-pimenta, estrepa-cavalo (CARVALHO et al., 2003), alecrim-do-campo (RAMÍREZ et al., 2009), salva-de-marajó e alecrim-d'Angola (OLIVEIRA et al., 2007). Na Colômbia é conhecido como orégano de monte (BEDOYA et al., 2014) ou somente orégano (BETANCUR-GALVIS et al., 2011).

Alguns dos seus sinônimos são bastante utilizados em publicações científicas, como *Lippia sidoides* Cham., *Lippia graveolens* Kunth e *Lippia microphylla* Cham.. Em revisão da seção *Goniostachyum* do gênero *Lippia*, O'Leary et al. (2012) estabeleceram 28 sinônimos para a espécie, sendo um do gênero *Lantana* e os demais de *Lippia*. No World Checklist of Selected Plant Families da Kew Royal Botanic Gardens, Govaerts e Atkins (2016) apontam 38 sinônimos, apresentando nomenclaturas dos gêneros *Lippia*, *Lantana* e *Goniostachyum* (sinônimo de *Lippia*) (Quadro 1.1).

Quadro 1.1- Listas de sinônimos de *Lippia origanoides* Kunth.

Sinônimos segundo O’Leary et al. (2012)	Sinônimos segundo Govaerts e Atkins (2016)
<i>Lantana origanoides</i> Martens & Galeotti	<i>Goniostachyum graveolens</i> (Kunth) Small
<i>Lippia affinis</i> Schauer	<i>Lantana origanoides</i> M.
<i>Lippia berlandieri</i> Schauer	<i>Lantana origanoides</i> var. <i>sampaionis</i> Herter
<i>Lippia berteroi</i> Spreng.	<i>Lippia affinis</i> Schauer
<i>Lippia candicans</i> Hayek	<i>Lippia berlandieri</i> M.
<i>Lippia elegans</i> Cham.	<i>Lippia berlandieri</i> Schauer
<i>Lippia elegans</i> var. <i>macrophylla</i> Moldenke	<i>Lippia berlandieri</i> Torr.
<i>Lippia elegans</i> var. <i>obtusifolia</i> Moldenke	<i>Lippia berteroi</i> Spreng.
<i>Lippia glandulosa</i> Schauer	<i>Lippia candicans</i> Hayek
<i>Lippia graveolens</i> Kunth	<i>Lippia elegans</i> Cham.
<i>Lippia graveolens</i> f. <i>macrophylla</i> Moldenke	<i>Lippia elegans</i> var. <i>macrophylla</i> Moldenke
<i>Lippia graveolens</i> f. <i>microphylla</i> Moldenke	<i>Lippia elegans</i> var. <i>obtusifolia</i> Moldenke
<i>Lippia graveolens</i> f. <i>loeseneriana</i> Moldenke	<i>Lippia glandulosa</i> Schauer
<i>Lippia palmeri</i> S. Watson	<i>Lippia graveolens</i> f. <i>loeseneriana</i> Moldenke
<i>Lippia palmeri</i> var. <i>spicata</i> Rose	<i>Lippia graveolens</i> f. <i>macrophylla</i> Moldenke
<i>Lippia mattogrossensis</i> Moldenke	<i>Lippia graveolens</i> f. <i>microphylla</i> Moldenke
<i>Lippia microphylla</i> Cham.	<i>Lippia graveolens</i> Kunth
<i>Lippia obscura</i> Briq.	<i>Lippia mattogrossensis</i> Moldenke
<i>Lippia pendula</i> Rusby	<i>Lippia microphylla</i> Benth.
<i>Lippia polycephala</i> Briq.	<i>Lippia microphylla</i> var. <i>fasciculata</i> Hiern
<i>Lippia polycephala</i> var. <i>aemilii</i> Briq.	<i>Lippia microphylla</i> var. <i>foliis-acutiusculis</i> Hiern
<i>Lippia rigida</i> Schauer	<i>Lippia obscura</i> Briq., Bull.
<i>Lippia rubiginosa</i> Schauer	<i>Lippia origanoides</i> var. <i>sampaionis</i> Herter
<i>Lippia rubiginosa</i> f. <i>pauper</i> Schauer	<i>Lippia palmeri</i> f. <i>spicata</i> (Rose) Moldenke
<i>Lippia salviifolia</i> Cham.	<i>Lippia palmeri</i> S.
<i>Lippia schomburgkiana</i> Schauer	<i>Lippia palmeri</i> var. <i>spicata</i> Rose
<i>Lippia sidoides</i> Cham.	<i>Lippia pendula</i> Rusby
<i>Lippia velutina</i> Schauer	<i>Lippia polycephala</i> Briq.
	<i>Lippia polycephala</i> var. <i>aemilii</i> Briq.
	<i>Lippia rigida</i> Schauer
	<i>Lippia rubiginosa</i> Schauer
	<i>Lippia rubiginosa</i> var. <i>dives</i> Schauer
	<i>Lippia rubiginosa</i> var. <i>pauper</i> Schauer
	<i>Lippia salviifolia</i> Cham.
	<i>Lippia schomburgkiana</i> Schauer
	<i>Lippia sidoides</i> Cham.
	<i>Lippia sidoides</i> f. <i>flaccida</i> Hayek
	<i>Lippia velutina</i> Schauer

### 1.2.1 Características morfológicas

Arbusto de 0,8-3 metros de altura (Figura 1.1D), caules geralmente densamente estrigosos, raramente hispídeos ou levemente estrigosos, entrenós com (1–)2–9 cm de comprimento. Folhas geralmente opostas, as vezes ternadas (Figuras 1.1C e 1.2E); pecíolos com 0,1–2,4 cm de comprimento, raramente com folhas sésseis, pubescência estrigosa raramente hispída; lâminas com 0,5–6,1 e 0,3–3,5 cm, elípticas ou ovaladas, base coniforme raramente redonda, ápice agudo raramente obtuso, margem crenada, venação pinada raramente acródroma, superfície adaxial estrigosa (Figuras 1.1C e 1.2G) e superfície abaxial seríceia (Figura 1.2F). Inflorescências frondosas (Figuras 1.1B, 1.1C e 1.2B), três a seis inflorescências

por axila, pedúnculo com 0,2–2,6 cm de comprimento, estrigoso, raramente hispido, inflorescência com 0,4–1,2 cm de comprimento, brácteas com 0,2–0,5 cm de comprimento, ápice curvado ou reto, brácteas apicais livres (Figura 1.2C), superfície abaxial levemente estrigosa apenas na base e ao longo da veia central, raramente toda a superfície pubescente (Figura 1.2D), superfície adaxial na maioria das vezes toda estrigosa. Cálice com 0,1–0,2 cm de comprimento, face externa estrigosa. Corola com 0,1–0,2 cm de comprimento, face externa levemente estrigosa. Nozes com 0,1–0,2 cm de comprimento (O'LEARY et al., 2012). Prancha disposta na figura 1.2.



Figura 1.1 - *Lippia origanoides* K.; A – ramo; B – inflorescência; C – Inflorescências e folhas; D – Planta inteira.



Figura 1.2 - *Lippia origanoides*: A/A'- Aspectos gerais da planta; B- Inflorescência; C- Bráctea floral; D- Tricomas pubescentes da bráctea; E- Superfície adaxial da folha; F- Tricomas pubescentes da superfície abaxial da folha; G- Tricomas pubescentes da superfície adaxial da folha; H- Distribuição geográfica. Prancha e legenda obtidas de O'Leary et al. (2012).

### 1.2.2 Usos etnobotânicos

*L. origanoides* destaca-se no gênero no que diz respeito ao uso popular na medicina tradicional, sendo também consumido no nordeste do Brasil e no México como tempero substituto do orégano (BETANCUR-GALVIS et al., 2011; SARRAZIN et al., 2015) e na Venezuela como estimulante do apetite na forma de decocto (PASCUAL et al., 2001).

O principal emprego relatado em levantamentos etnofarmacológicos é no tratamento de distúrbios gastrointestinais, sendo consumido como decocto ou infusão nas Américas do Sul e Central, África tropical e parte da Europa (PASCUAL et al., 2001). *L. origanoides* é uma das espécies mais citadas por ribeirinhos do município de Manacapuru, estado do Amazonas, para o tratamento de problemas digestivos como dor de estômago (VÁSQUEZ et al., 2014). Flatulência (OLIVEIRA et al., 2014), indigestão, diarreia e disenteria são outras desordens tratadas com esta planta, sendo usada também como antisséptico intestinal (PASCUAL et al., 2001).

Outra importante aplicação medicinal de *L. origanoides* é no tratamento de doenças respiratórias, comumente usada na forma de decocção ou inalação. No estado do Piauí, esta espécie é utilizada para tratar gripe, resfriado e infecções pulmonares; na Venezuela, é utilizada também para tratamento de bronquite e asma (RAMÍREZ et al., 2009). No cariri pernambucano é aplicada como antisséptico das vias nasais (AGRA et al., 2007). Sinusite (PASCUAL et al., 2001), dor de garganta (OLIVEIRA et al., 2014) e tosse (SIMÕES et al., 2015) também são tratadas com esta planta. Em levantamentos etnofarmacológicos realizados na caatinga do Nordeste do Brasil, aparece como remédio para problemas respiratórios e como antisséptico em geral (AGRA et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2007).

*L. origanoides* é usada também contra desordens menstruais tanto no Brasil quanto na América Central (PASCUAL et al., 2001), sendo relatado por parteiras da comunidade quilombola de Oriximiná (Brasil) como uma das plantas mais importantes, principalmente para a saúde das mulheres. É usada contra cólicas menstruais, expulsar o sangue do pós-parto, “descarrega” vaginal e limpeza do sangue menstrual retido, banho vaginal, inflamação uterina e alívio das cólicas pós-parto (OLIVEIRA et al., 2014). Estes autores levantaram ainda usos em bebês e crianças no combate a cólicas e “vento caído” no cordão umbilical. No México é empregada como abortivo e antifertilidade (PASCUAL et al., 2001).

Esta planta é empregada como calmante (OLIVEIRA et al., 2014), analgésico, anti-inflamatório e/ou antipirético (PASCUAL et al., 2001). Seu óleo essencial é usado por comunidades pobres do Brasil como alternativa na cura de feridas, picadas de insetos e dores

de garganta (BOTELHO et al., 2016). No México seu decocto é considerado um tratamento eficiente no controle de diabetes (PASCUAL et al., 2001).

### 1.2.3 Atividades biológicas

Os metabólitos secundários de *L. origanoides* vêm sendo bastante estudados e têm revelado o grande potencial prospectivo desta espécie em segmentos diversos. A avaliação da composição química e das propriedades farmacológicas de seus extratos e óleo essencial correspondem ao maior volume das pesquisas científicas com a espécie, no entanto, existem estudos em outras áreas demonstrando o potencial dos seus compostos, por exemplo, na pecuária (BETANCOURT et al., 2012), na agricultura (BEDOYA et al., 2014; OLIVERO-VERBEL et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2014) e na indústria de alimentos (SARRAZIN et al., 2015).

A atividade antimicrobiana desta espécie é bastante estudada e vem mostrando bons resultados tanto sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas quanto contra fungos filamentosos e leveduras, corroborando seu uso etnofarmacológico como antisséptico (PASCUAL et al., 2001). Avaliado contra 11 fungos e bactérias, o óleo essencial das folhas desta planta apresentou resultados superiores aos obtidos pelas drogas anfotericina B, vancomicina e meticilina (OLIVEIRA et al., 2007). A atividade antifúngica do óleo essencial das folhas também foi observada por Bedoya et al. (2014) frente ao fitopatógeno infestante da cultura de babata, *Phytophthora infestans*. Sarrazin et al. (2015) detectaram potente ação antibacteriana de seu óleo essencial das partes aéreas sobre *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* e *Salmonella typhimurium*.

Por sua vez, os extratos metanólicos das folhas e do caule de *L. origanoides* apresentaram Concentrações Inibitórias Mínimas (MIC) próximas das drogas padrão para *Staphylococcus aureus* (resistente a estreptomicina e di-hidro-drostreptomicina), *Staphylococcus aureus* (resistente à novobiocina), *Escherichia coli* (resistente à sulfonamida), *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* (resistente a fluconazol e anfotericina B) e *Candida parapsilosis* (resistente a fluconazol e anfotericina B) (PINTO et al., 2013).

O óleo essencial das partes aéreas de *L. graveolens* (sinônimo de *L. origanoides*) conteve a proliferação de trofozoítos de *Giardia lamblia*, principalmente na maior concentração (400 µg/mL), reduziu a viabilidade deste micro-organismo após sete horas para menos de 40% em relação ao controle negativo e também minimizou a sua capacidade de aderência no tecido do hospedeiro de 70% (controle negativo) para 10%. Além disso, o óleo essencial não

apresentou efeito citotóxico sobre as células bovinas, demonstrando viabilidade de uso farmacológico (MACHADO et al., 2010). Escobar et al. (2010) também verificaram ação antiprotozoária contra *Trypanosoma cruzi* e/ou *Leishmania chagasi* dos óleos essenciais das partes aéreas de seis populações de *L. origanoides* coletadas na Bolívia, alguns deles apresentaram citotoxicidade contra células de leucemia mielogênica aguda.

A atividade citotóxica também foi estudada em naftoquinonas isoladas de raízes de *L. microphylla* (sinônimo de *L. origanoides*). A microphyllaquinona e principalmente os isômeros de metoxinafto[2,3-b]furan-4,9-quinona apresentaram citotoxicidade contra células humanas de adenocarcinoma de mama, adenocarcinoma de cólon, leucemia promielocítica, leucemia linfocítica e melanoma murino em testes *in vitro* (SANTOS et al., 2003). Outrossim, testes *in vivo* mostraram inibição de 60% do crescimento do tumor de sarcoma 180 em camundongos Swiss, quando administrada dose de 100 mg/kg de óleo essencial das folhas, apresentando toxicidade moderada comparada com outras drogas anticâncer (XAVIER et al., 2015). Além da citotoxicidade sobre células cancerígenas, o óleo essencial obtido a partir de folhas e inflorescências *L. origanoides* apresentou expressiva ação antígeno-tóxica, protegendo em 100% o material genético de *Escherichia coli* do dano induzido por bleomicina, droga usada no tratamento do câncer que despolariza e quebra o DNA (VICUÑA et al., 2010).

O extrato hidroalcoólico da parte aérea de plantas cultivadas na cidade de Oriximiná, Pará, apresentou efeito antinociceptivo (analgésico) igual ou superior ao produzido pelo ácido acetilsalicílico, reduzindo 90% das contrações abdominais induzidas por ácido acético com administração de 100mg/kg. No teste de formalina, o extrato apresentou ação antinociceptiva apenas na fase 2, em que a nocicepção é associada a reação inflamatória, reduzindo o tempo de lambida de 172,9 s (veículo) para 39,2 s na dose de 100mg/kg (cerca de 40 s para 100mg AAS/kg). E por fim, o extrato nesta mesma dose manteve a elevação no tempo de permanência durante todo o experimento no teste de placa quente, semelhante ao observado com uso de morfina (5mg/kg) (OLIVEIRA et al., 2014).

Potente ação contra insetos foi verificada para o óleo essencial obtido da planta inteira, o qual promoveu repelência de 98% dos escaravelhos *Tribolium castaneum* (H.), praga em grãos estocados, mostrando uma ação superior ao repelente comercial (78%) (OLIVERO-VERBEL et al., 2009). O óleo essencial de *L. origanoides* apresentou ainda ação inseticida contra larvas de *Aedes aegypti* (Linn.), alcançando uma taxa de mortalidade de 82% após 48 horas com o uso de 90 mg/L, porém seu desempenho melhorou quando associado ao óleo essencial de *L. alba*, atingindo a taxa de 70% de mortalidade com apenas 45 mg/L (VERA et al., 2014), demonstrando o potencial de uso destes óleos para o combate ao vetor dos vírus



transmissores de dengue, chicungunha e zica, doenças que constituem epidemias atuais no Brasil. Teixeira et al. (2014) observou também ação inseticida do óleo essencial das folhas frente a adultos e ninfas de pulgão *Myzus persicae* Sulzer, uma praga agrícola.

*L. origanoides* mostrou-se eficiente na inativação do vírus causador da febre amarela em cultura de células, chegando a 100% de inibição quando as culturas foram tratadas com 3,7 µg/mL do seu óleo essencial (MENESES et al., 2009).

O extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *L. origanoides* reduziu a pressão sanguínea de ratos e apresentou ação bradicárdica leve quando administrada dose igual ou superior a 12,5 mg/kg via intravenosa. A atividade hipotensiva deste extrato também foi observada em aplicação oral nas doses de 100 mg/kg e 200 mg/kg (COELHO et al., 2015).

A atividade antioxidante do óleo essencial das partes aéreas de *L. origanoides* foi de 84,2% de inibição da oxidação do β-caroteno a 1mg/L, valor equivalente ao obtido com o uso de Trolox (93,4%) (SARRAZIN et al., 2015). Resultados semelhantes foram obtidos por Teixeira et al. (2014) para o óleo essencial das folhas. A pinocembrina, flavanona presente no extrato do quimiotipo com *p*-cimeno e α-felandreno como majoritários (quimiotipo A), obtido pelo método de extração por fluido supercrítico, apresenta reconhecida eficiência na ação antioxidante e também possui funcionalidade potencial no tratamento do câncer (STASHENKO et al., 2010).

Na criação de frango, a adição à ração de óleo essencial de *L. origanoides* de quimiotipo C (rico em timol) mostrou-se uma boa alternativa ao uso de antibióticos sintéticos, promovendo melhora da conservação da ração, aumento do ganho de peso e suavizando os efeitos negativos de infecção bacteriana (BETANCOURT et al., 2012).

#### 1.2.4 Composição química

O óleo essencial é o principal alvo dos estudos químicos de *L. origanoides*, na maioria das vezes, sendo obtido por hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger e analisado por cromatografia gasosa. Os terpenos *p*-cimeno e γ-terpineno são os mais frequentemente encontrados em quantidades significativas. Na literatura científica são descritos óleos essenciais de plantas de *L. origanoides* com grande variação no perfil químico. Diferenças experimentais como no local, horário e estação climática do momento da coleta podem justificar essa variação química, porém também se constatou a existência de quimiotipos diversos. A presença e a concentração dos monoterpenos carvacrol e timol são os fatores mais relevantes na diferenciação entre quimiotipos e na determinação da ação biológica dos óleos (STASHENKO

et al., 2010).

Escobar et al. (2010) analisaram óleos essenciais da parte aérea de plantas de seis populações de *L. organoides* coletadas entre 2005 e 2006 na Colômbia. Duas delas apresentaram perfis distintos, apesar de terem sido coletadas na mesma localidade (Jordán Sube, Santander). Uma delas apresentou 36,5% de carvacrol, 9,2% de timol, 13,9% de *p*-cimeno, 13,2% de  $\gamma$ -terpineno, 1,6% de *trans*- $\beta$ -cariofileno e 0,7% de  $\alpha$ -felandreno, enquanto a outra possuiu apenas 0,5% de carvacrol, 2,2% de timol e 1,9% de  $\gamma$ -terpineno, sendo os majoritários o *p*-cimeno com 15,7%, o *trans*- $\beta$ -cariofileno com 9,4% e o  $\alpha$ -felandreno com 8,7%. A amostra coletada em Bucaramanga (Santander) apresentou o perfil próximo ao primeiro e a obtida de Los Santos (Santander) possuiu perfil semelhante ao segundo. As demais populações foram semelhantes à primeiramente descrita, exceto pelas concentrações do carvacrol e do timol, que em Mercaderes (Cauca) foram de 0,7% e 56,6%, respectivamente; e em Piedecuesta (Santander) alcançaram 46,2% e ausente, respectivamente.

Vicuña et al. (2010) também encontraram variação nos perfis dos óleos de dois espécimes coletados no cânion do rio Chicamocha, Colômbia. Um deles contendo carvacrol e timol em altas concentrações, 25,8% e 34,5%, respectivamente, seguidos por *p*-cimeno (9,3%) e  $\gamma$ -terpineno (9,1%). A outra planta continha 59,6% de timol, 8,4% de *p*-cimeno, 7,3% de  $\gamma$ -terpineno e ausência de carvacrol.

Ainda na Colômbia, Betancourt et al. (2012) estudaram planta coletada entre março e abril na microrregião de Alto Pátia, Santander, e detectaram a predominância de timol (78,7%), seguido de *p*-cimeno (6,6%) e  $\gamma$ -terpineno (2,7%), com o carvacrol compondo somente 0,9% do óleo.

Machado et al. (2010), sem especificar a origem do material vegetal, também obtiveram óleo essencial de *L. organoides* (sob o sinônimo *L. graveolens*) em que o timol foi o composto majoritário, com 19,8%, *p*-cimeno o segundo, com 16,9% e carvacrol presente apenas em 0,5%. Nesta amostra, a concentração de  $\gamma$ -terpineno também se mostrou bastante reduzida, 0,2%.

O óleo essencial da parte aérea de plantas cultivadas em Oriximiná, estado do Pará, e coletadas no mês de outubro de 2002, apresentou como componente majoritário o monoterpene carvacrol (38,6%), seguido por timol (18,5%), *p*-cimeno (10,3%) e  $\gamma$ -terpineno (4,1%), tendo como principal sesquiterpene o (*E*)-cariofileno (5,9%) (OLIVEIRA et al., 2007).

O óleo essencial de *L. organoides* Kunth. (sob o sinônimo *L. sidoides*) coletado nos estados de Sergipe e Bahia apresentou 43,69% de carvacrol, 17,8% de *p*-cimeno, 16,6% de  $\gamma$ -terpineno, 6% de timol, 4,1% de metil timol e 3,5% de mirceno (SANTOS et al., 2016).

O material coletado de plantas propagadas vegetativamente e cultivadas na cidade de

Bucaramanga, na Colômbia, apresentou os componentes majoritários carvacrol com 44% e timol com 15%, no entanto, o terceiro principal componente foi  $\gamma$ -terpinene com 10% (MENESES et al., 2009).

Diante de todas estas variações, Stashenko et al. (2010) desenvolveram estudos com plantas coletadas em dez locais da Colômbia, com vários espécimes de cada população, todos em período de floração. Através do cálculo estatístico de Análise de Componentes Principais, foi possível agrupar estas populações em três quimiotipos, cada um com perfil químico e rendimento de óleo essencial característicos.

Plantas do quimiotipo A são mais frequentes na Colômbia e apresentam forte cheiro cítrico, baixo rendimento de óleo essencial (cerca de 1,0-1,5%) e alta concentração de hidrocarbonetos terpênicos, sendo majoritários os monoterpenos *p*-cimeno,  $\alpha$ -felandreno,  $\beta$ -felandreno, limoneno e 1,8-cineol (cerca de 12%, 8%, 6%, 5% e 4%, respectivamente) e os sesquiterpenos trans- $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, oxido de cariofileno e  $\alpha$ - e  $\beta$ -eudesmol (cerca de 9%, 5%, 3% e 3,5%, respectivamente). O quimiotipo B é mais amplamente distribuído, frequente no Brasil, possui forte aroma de orégano, com rendimento mais elevado (cerca de 3,6-4,4%) e é rico em compostos oxigenados e hidrocarbonetos terpênicos. Seus monoterpenos mais abundantes são carvacrol, *p*-cimeno,  $\gamma$ -terpineno e timol (cerca de 40%, 13%, 11%, 11%, respectivamente). Por fim, os representantes do quimiotipo C também são amplamente distribuídos, frequentes no Brasil, exalam odor de orégano e possuem maior parte de compostos oxigenados e hidrocarbonetos terpênicos, entretanto, têm rendimento intermediário (cerca de 2,4-3,1%) e seus componentes majoritários são os monoterpenos timol, *p*-cimeno e  $\gamma$ -terpineno (cerca de 56%, 9% e 5%, respectivamente) (STASHENKO et al., 2010).

Quanto aos extratos obtidos pelo método de extração por fluido supercrítico dos referidos quimiotipos, foram encontradas apenas poucas variações na quantidade dos compostos, com exceção do extrato do quimiotipo A, no qual foi encontrada a flavanona pinocembrina na concentração de 0,8 mg/g de planta seca (STASHENKO et al., 2010).

Pinto et al. (2013), analisando quatro frações dos extratos metanólicos de folhas e do caule de *L. origanoides* coletados em outubro de 2006 em Rio de Contas, Bahia, detectaram presença de triterpenos, terpenos e esteróis em todas as frações, em contrapartida nenhuma delas apresentou alcaloides. Flavonoides e ácidos fenólicos não compunham apenas a fração hexânica do caule. Cumarinas e antraquinonas foram detectadas nas frações hexânicas de ambos os órgãos e na fração de diclorometano das folhas, e por fim, saponinas apareceram nas frações de acetato de etila e aquosa dos dois órgãos.

Do extrato etanólico da raiz de *L. origanoides* coletada no mês de abril de 1999 em

Várzea Alegre, Ceará, foram isolados dois dímeros de naftoquinonas prenilatadas, a tocomaquinona I e microphyllaquinona (nova) e dois dímeros de furanonaftoquinonas, metoxinafto[2,3-b]furan-4,9-quinona, todas com ação anticancerígena (SANTOS et al., 2003).

Em otimização e padronização do método de extração de partes aéreas de *L. origanoides* coletadas em 2013 em José de Freitas, Piauí, visando a exploração da propriedade anti-hipertensiva, Coelho et al. (2015) verificaram alta eficiência da extração hidroalcoólica água/etanol 1:1 (v/v), que apresentou maior rendimento do extrato e maior concentração de flavonoide (naringenina), sem necessidade de sonicação ou de tempo superior a 24 horas de contato com o solvente. A naringenina foi o composto majoritário com concentrações de 37,3 mg/g de extrato (3,3%), podendo ser utilizada como biomarcador para controle de qualidade do extrato hidroalcoólico.

### 1.3 Variação química e atividade biológica de plantas medicinais

A atividade biológica de plantas é determinada pela presença e concentração de metabólitos secundários. Um dos critérios para a determinação da qualidade de plantas medicinais usadas como matéria-prima na produção de medicamentos é a existência de seus princípios ativos em concentrações adequadas (MIGUEL & MIGUEL, 2004).

As diferenças nos usos de uma mesma espécie de planta medicinal observadas entre comunidades podem estar relacionadas a variações na composição química da planta. Elas podem ser provocadas pelas condições ambientais, por exemplo, diferenças no solo, pluviosidade, temperatura ou por variação genética – quimiotipos (GORELICK & BERNSTEIN, 2014).

Em plantas de *L. origanoides* cultivadas em campo, esta relação entre composição química e atividade biológica foi constatada pela redução do componente majoritário carvacrol ao longo do tempo, de 56,53% para 33,23%, que promoveu diminuição significativa da capacidade antioxidante pelo sequestro de radical livre DPPH• de 0,71 mg/mL para até 2,08 mg/mL (CE<sub>50</sub>) em plantas cultivadas com adubação orgânica (TELES et al., 2014).

Comparando diferentes quimiotipos desta mesma espécie, Escobar et al. (2010) observaram que o quimiotipo que possuía como majoritários do óleo essencial o carvacrol com 38,8% e o timol com 15,1% apresentou ação contra epimastigotas (CI<sub>50</sub> 32,8 µg/mL) e amastigotas (CI<sub>50</sub> 53 µg/mL) de *Trypanosoma cruzi*, promastigotas (CI<sub>50</sub> 16 µg/mL) de *Leishmania chagasi* e células leucêmicas tipo THP-1 (CC<sub>50</sub> 76,1 µg/mL). Por outro lado, o quimiotipo que tinha apenas 0,5% de carvacrol e 2,2% de timol mostrou-se menos ativo,

apresentando somente ação contra epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (CI<sub>50</sub> 40,1 µg/mL).

Numa avaliação sazonal da atividade biológica e composição química do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L., Hussain et al. (2008) verificaram maiores atividades antioxidante, sequestradora de radical livre e antibacteriana do óleo essencial coletado no inverno, com 60,6% de linalool e 3,0% de cânfora, e a menores atividades no óleo essencial obtido no verão, com 57,7% de linalool e 1,1% de cânfora. Por outro lado, o primeiro óleo essencial apresentou a pior atividade antifúngica, provavelmente por possuir menor quantidade de *epi*- $\alpha$ -cadinol (8,6%) e  $\gamma$ -cadinene (3,2%), já que o óleo essencial do outono apresentou os melhores resultados contra os fungos testados e as maiores concentrações destes terpenos (12,4% e 5,3%, respectivamente).

Plantas de *Rosmarinus officinalis* L. coletadas em três regiões da Turquia e em quatro meses (dezembro, abril, junho e setembro) mostraram diferenças tanto na composição química dos óleos essenciais quanto na atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos frente a nove micro-organismos (CELIK TAS et al., 2007). Entretanto, a variação do terpeno majoritário ao longo do tempo não pode ser relacionada com a variação na atividade biológica. Possivelmente, outros componentes do extrato foram mais determinantes. Nas diferenças entre os locais de coleta houve relação. As plantas da região de Canakkale apresentaram maior concentração de cânfora e melhores resultados frente aos micro-organismos, por outro lado, as da região de Mersin apresentou a menor porcentagem de cânfora e em geral os piores resultados nos testes biológicos.

Para quatro espécies de *Mentha* coletadas de populações selvagens no Paquistão durante o inverno e o verão, o óleo essencial obtido no verão apresentou maior atividade citotóxica contra células do câncer de mama MCF-7 e/ou do câncer de próstata LN-CaP quando comparado ao óleo essencial do inverno. Porém, apenas em *M. piperita* (L.) o composto majoritário, mentona, foi maior no verão (28,13%) que no inverno (25,54%). O composto majoritário de *M. longilolia* (L.), óxido de piperitenona, e de *M. spicata* (L.), carvona, formam maiores no inverno (64,6% e 63,25%, respectivamente) que no verão (40,1% e 59,5%), respectivamente (HUSSAIN et al., 2010).

Estes resultados evidenciam que, em geral, a variação da atividade biológica não está associada a concentração de apenas um composto, sendo resultado da soma ou sinergismo dos diferentes constituintes dos extratos e óleos essenciais.

#### 1.4 Fatores que influenciam no conteúdo de metabólitos secundários

As plantas são organismos sésseis, sem possibilidade de deslocamento para, por exemplo, buscar condições ambientais mais favoráveis, ir ao encontro de parceiros para reprodução ou para se proteger de ataque de herbívoros. Assim sendo, foram selecionadas, ao longo de seu processo evolutivo, estratégias para reagir às circunstâncias externas que garantissem sua sobrevivência e a continuidade de sua descendência. Muitas destas adaptações são morfológicas, como as folhas em formato de espinhos das cactáceas que conferem proteção contra herbivoria e reduz a perda hídrica comparadas a folhas com limbo, e o labelo (pétala modificada) das orquídeas que tem por função atrair ou guiar os polinizadores (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Entretanto, grande parte das adaptações vegetais consiste em alterações metabólicas que culminam na produção de compostos secundários ao metabolismo universal desses organismos, em resposta a estímulos do ambiente circundante, muitos deles compostos com propriedades de interesse bioprospectivo. Os metabólitos secundários possuem funções variadas na planta, podendo ter finalidades estruturais ou de proteção física (ex. lignina e calose), de defesa, de atração de polinizadores ou predadores de pragas, de adaptação e resiliência a mudanças nas condições ambientais, entre outras. Diversos fatores interferem na produção de metabólitos e determinam mudanças nestes processos (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

O aspecto genético é o principal fator que delinea a síntese e o acúmulo destes compostos em uma planta, uma vez que os genes são o molde da produção de proteínas e enzimas fundamentais nos processos metabólicos e diferentes codificações genéticas acarretam respostas bioquímicas diversas. A carga genética é a responsável por diferenças na composição e/ou na concentração de metabólitos secundários, por exemplo, entre órgãos distintos de uma planta, plantas ou órgãos com idades diferentes, indivíduos de mesma espécie e entre espécies distintas, quando as condições ambientais são as mesmas (FIGUEIREDO et al., 2008).

Pandeló et al. (2012), comparando folhas coletadas de diferentes posições na planta de *L. alba*, obtiveram maior produção de óleo essencial em folhas oriundas do quarto segmento nodal, enquanto que, em folhas do primeiro seguimento nodal, não havia produção de óleo essencial. Estes resultados foram corroborados por análises que revelaram alta expressão nas folhas do quarto seguimento nodal de três genes que fazem parte da síntese de terpenos, e baixa expressividade em folhas do primeiro segmento nodal.

Outro exemplo do fator genético sobre a produção de compostos foi verificado por Stashenko et al. (2010), que em coleta na mesma área (Bucaramanga, Santander, Colômbia)

detectaram três diferentes quimiotipos de *L. origanoides*. Blank et al. (2015) analisaram 48 acessos de *L. alba* de vários locais do país sob mesmas condições de cultivo e constataram seis padrões bastante diferenciados de produção de compostos voláteis, que foram separados em quimiotipos.

Além do fator genético e das características intrínsecas à planta, como idade e fase de desenvolvimento, existem fatores ambientais que podem influenciar a expressão de genes ou a ativação de enzimas relacionadas com a produção de metabólitos secundários (FIGUEIREDO et al., 2008). Estes agentes podem ainda agir sobre o processo fotossintético, alterando a fixação de carbono e a produção de biomassa, e por proporcionalidade, modificar a quantidade destes compostos na planta (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Dentre os fatores ambientais estão a disponibilidade de nutrientes e de água no solo, humidade do ar, a altitude, a poluição, a intensidade de radiação solar e a temperatura, que vêm mostrando influência na produção de produtos secundários de interesse. A sazonalidade e o ritmo circadiano são fatores de grande relevância quando se trata de produção de metabólitos secundários, principalmente por estarem vinculados a um conjunto de mudanças simultâneas de vários fatores ambientais, como pluviosidade, temperatura e radiação solar (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

A composição e o rendimento do óleo essencial de *L. origanoides* sofrem grande influência tanto da sazonalidade quanto do ritmo circadiano. Bedoya et al. (2014) observaram que a concentração de timol variou de 80,3% na época seca para 64,9% na época chuvosa. Silva et al. (2009) observaram variação nas concentrações de timol de 53,2% e carvacrol de 0,71% às oito da manhã, para 5,33% e 42,88% ao meio dia, respectivamente, e às 16 horas de 56,01% de timol e carvacrol ausente.

Ribeiro et al. (2014) avaliaram as variações tanto diárias quanto sazonais no óleo essencial desta planta, que apresentou o maior rendimento no período seco do ano (4,6%) e o menor valor no período chuvoso (2,1%). Em relação à composição, os terpenos majoritários ao longo do dia no período seco foram: 1,8-cineol com 19,4% às 06:00 horas; *p*-cimeno com 26% às 9:00 horas; o (*E*)-metil-cinamato com 26,6% às 12:00 horas; o (*E*)-nerolidol com 14,7% às 15:00 horas; e por fim o 1,8-cineol com 16,8% às 18:00. No período chuvoso os componentes principais foram: o 1,8-cineol com 25,3% às 6:00 horas; o  $\alpha$ -pineno com 18,7% às 9:00; o 1,8-cineol com 19,2% às 12:00; o  $\alpha$ -pineno com 18,1% às 15:00; e o (*E*)-nerolidol com 46,7% às 18:00. Estes resultados mostram o quanto a biossíntese de terpenos voláteis pode ser afetada pelas condições ambientais, como temperatura, umidade e luminosidade.

Outros fatores ambientais estão relacionados às interações biológicas. Na alelopatia, os

metabólitos secundários vegetais são produzidos para evitar o crescimento ou desenvolvimento de outras plantas no entorno, eliminando a competição por recursos (nutrientes, polinizadores, luminosidade, etc.). Na interação com polinizadores, dispersores de sementes e predadores de herbívoros, os compostos secundários agem como atrativos, permitindo que haja trocas de serviços entre as partes, em relações mutualísticas. Nos processos de defesa vegetal, algumas substâncias secundárias são produzidas e armazenadas nas células anteriormente ao ataque de patógenos ou herbívoros, agindo de maneira preventiva, enquanto outras substâncias somente têm sua síntese ativada ou intensificada após o estímulo gerado pelo ataque destes organismos (TAIZ E ZEIGER, 2009).

### 1.5 Respostas de defesa em plantas e ativação do metabolismo secundário

Ao receber ataque de herbívoros e parasitas, as plantas desenvolvem vários processos bioquímicos, fisiológicos e físicos, que promovem a defesa vegetal. O sistema de defesa de uma planta é complexo e envolve a ativação de rotas metabólicas paralelas ou cruzadas que culminam na produção de compostos diversos, tornando a reação de defesa mais efetiva (ZHAO et al., 2005). O dano à membrana celular causado pelo ataque desencadeia, entre outras ações, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e a ativação de cascatas de sinalização que culminam na produção de enzimas, proteínas e produtos secundários, atuando contra os agentes agressores (TAIZ E ZEIGER, 2009).

O primeiro passo da defesa vegetal é a detecção de elicitores por receptores na membrana plasmática ou no citoplasma das células vegetais. Elicitores são compostos oriundos do agente biológico agressor ou da própria célula vegetal danificada que se ligam a receptores na membrana vegetal e ativam a defesa da planta, podendo ser fragmentos de fungos ou da parede celular do vegetal e compostos de bactérias, vírus e herbívoros (BRUCE & WEST, 1982).

Os elicitores podem ser de dois tipos. Os inespecíficos são substâncias presentes no metabolismo comum de fungos, de bactérias ou de herbívoros, detectados por receptores responsáveis por sinalizar e ativar respostas gerais de defesa em várias espécies de plantas. Portanto, tanto micro-organismos patogênicos como não patogênicos podem ativar esses mecanismos de defesa vegetal. Por outro lado, os elicitores específicos correspondem a produtos de genes responsáveis por facilitar a adaptabilidade de patógenos. Neste sentido, variedades de plantas com resistência a um patógeno, que possui esses fatores de virulência, apresentam receptores específicos para cada fator, também denominados de proteínas R, e por



isso, conseguem desenvolver reação a infecção em tempo hábil e impedir o estabelecimento da doença (RESENDE et al., 2007). Uma única planta é capaz de produzir diversos receptores R, o que torna possível sua reação defensiva a diferentes agentes agressores. Por conseguinte, a depender de quais receptores serão ativados pelo elicitador, diferentes metabólitos secundários podem ser sintetizados (ZHAO et al., 2005).

A transdução de sinal entre o receptor ativado e rotas de defesa pode ser feita via proteínas G, que se ligam a esses receptores mediando, na membrana plasmática, a ativação de canais iônicos e explosão oxidativa, ou via fosfolipases, assim, acionando rotas de produção de metabólitos secundários de defesa. O principal canal iônico ativado durante a reação de defesa vegetal é o canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , também ativado por outros fatores ambientais como o frio, o déficit hídrico e peróxido de hidrogênio exógeno. O  $\text{Ca}^{2+}$  que entra na célula pode ligar-se ao seu principal sensor, a calmodulina, e ativar fatores de transcrição e as enzimas de membrana proteína-quinase, proteína fosfatase e ainda a NADPH oxidase, que é a principal via produtora de ERO's. Este cátion regula ainda fosfolipases de vias de síntese de importantes mensageiros de expressão de genes de defesa, como o ácido jasmônico (HU et al., 2007).

A explosão oxidativa é um importante passo inicial na defesa de plantas e corresponde ao aumento da concentração de ERO's ( $\text{O}_2^-$ ,  $\bullet\text{OH}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) na área do tecido sob ataque. As ERO's são produzidas nos cloroplastos, mitocôndrias e nos peroxissomas, entretanto, na explosão oxidativa a principal fonte destas moléculas é a atividade da NADPH oxidase e de peroxidases apoplásticas. Além disso, ocorre a inativação de enzimas antioxidantes responsáveis por neutralizar as ERO's produzidas no metabolismo celular. As funções das ERO's são o combate direto ao micro-organismo, inibindo o crescimento e reduzindo a viabilidade destes devido a sua toxicidade, e a ativação de reações que fortalecem a parede celular das células atacadas, impedindo a expansão do invasor (MELLERSH et al., 2002).

Entre as ERO's, o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) é a mais importante por não possuir carga e ser menos instável que o superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e a hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ). Esse composto pode, portanto, ultrapassar as membranas celulares com maior rapidez e alcançar maiores distâncias na célula. Essas propriedades propiciam ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  ter várias funções no processo de defesa da planta, principalmente na sinalização celular (RESENDE et al., 2003). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode atuar na ativação da síntese de ácido jasmônico, que ativa a expressão de genes de defesa, promovendo o acúmulo de metabólitos secundários contra micro-organismos e herbívoros. Possui ainda função de desencadear a reação de hipersensibilidade (HR), causando a apoptose localizada das células vegetais circunvizinhas ao micro-organismo, limitando seu crescimento. Esta molécula participa da síntese de lignina, produzida para reforçar as paredes celulares vegetais ante o

ataque, e também ativa enzima da síntese do ácido salicílico, sinalizador da SAR, resistência sistêmica adquirida, que é a produção de enzimas, proteínas e metabólitos secundários após o contato com um patógeno (RESENDE et al., 2007).

Tendo em vista os mecanismos de ativação do metabolismo secundário nas respostas de defesa de plantas, bem como as funções ecológicas que estes compostos desempenham, torna-se importante o estudo de estratégias para aumentar a ativação destas vias e potencializar a produtividade das plantas medicinais, as quais muitas vezes possuem reduzida quantidade de princípios ativos. Nesse contexto, a utilização de elicitores ou de substâncias que participem destas vias metabólicas, principalmente como sinalizadores, mostra-se uma possibilidade real e eficiente para alcançar este objetivo.

#### 1.6 Elicitação e produção de metabólitos secundários de interesse

A elicitação, como mencionado anteriormente, corresponde à ativação de receptores por componentes biológicos, desencadeando reações de defesa nas plantas. No entanto, este termo também é empregado de forma ampla para agentes bióticos e abióticos que podem ser utilizados para promover a produção ou o aumento da concentração de determinado metabólito de interesse, em resposta ao estresse (ZHAO et al., 2005). Os elicitores abióticos podem ser substâncias inorgânicas ou fatores físicos, como por exemplo metais, luz UV, dano mecânico e peróxido de hidrogênio exógeno. Os elicitores bióticos podem ser fragmentos de microorganismos patogênicos ou não, e compostos oriundos de fungos, bactérias, nematoides e animais que ao serem aplicados em plantas ou cultura de células vegetais provoquem alteração em seu metabolismo secundário (GORELICK & BERNSTEIN, 2014).

A maior parte das pesquisas sobre elicitação vegetal é realizada em culturas de células, principalmente pela possibilidade de controle total das condições ambientais, o que não é possível em estudos em campo ou em casa de vegetação. Por outro lado, os estudos com cultivo em solo permitem maior proximidade com a realidade de produção comercial de plantas medicinais. Em campo, as plantas estão expostas a fatores ambientais mais próximos aos existentes em cultivos comerciais. Entre eles estão a variação na intensidade luminosa com fonte natural de luz, ventos, chuvas, contato com polinizadores, componentes biológicos, químicos e físicos do solo, etc. Assim, pode-se entender a efetividade dos resultados do tratamento testado em condição real de cultivo.

A importância da elicitação na produção de compostos bioativos de interesse pôde ser verificada por Komaraiah et al. (2002). Esses autores observaram que a adição de elicitor do

fungo *Aspergillus niger* aumentou em quase quatro vezes a produção de plumbagina (16,56 mg/g) em comparação com o controle (4,31 mg/g) em cultura de células de *Plumbago rosea* L.. A maior acumulação desta naftoquinona foi observada quando as células foram tratadas com quitosana (28,94 mg/g), polissacarídeo derivado da quitina com ação elicitora comprovada, aumentando quase sete vezes a produção deste produto secundário.

Em culturas de células de fumo, tratamentos com extrato bruto de *Fusarium solani* f.sp. *robiniae* e com metil jasmonato ativaram de maneira parecida a enzima chave do metabolismo dos fenilpropanoides, a fenilalanina amônia liase (PAL). Neste estudo, apenas o metil jasmonato aumentou a produção de escopoletina e escopolina. Estes resultados sugerem que compostos presentes no extrato bruto do fungo estudado elicitaram as células de fumo, ativando a rota de síntese dos fenilpropanoides, todavia, provavelmente foram produzidos compostos distintos dos estudados, demonstrando a grande amplitude de respostas de defesa das plantas (SHARAN et al., 1998).

Plântulas de milho cultivadas em casa de vegetação e transferidas para frascos contendo solução de material regurgitado de lagarta do cartucho e de gafanhoto apresentam elevada produção de compostos voláteis quando comparados ao controle, que praticamente não produziu esses voláteis. Aquelas plantas demonstraram atratividade aumentada de insetos parasitas de larvas herbívoras, atestando a função protetora contra herbivoria dos terpenos voláteis produzidos (TURLINGS et al., 1993). Alborn et al. (1997) isolaram do material regurgitado de lagartas do cartucho, a volicitina, substância presente na saliva da lagarta semelhante ao ácido linoleico, precursor do ácido jasmônico em plantas, que também promoveu a produção destes compostos nas plântulas de milho tratadas, em quantidades um pouco menores, mostrando ser o principal elicitor presente no regurgito destas larvas.

Estudos também evidenciam o efeito sinérgico de elicitores no aumento da produção de metabólicos. Em culturas de células de *Taxus chinensis*, a adição de ácido salicílico ao tratamento com elicitor de um fungo extraído de plantas da mesma espécie além de reduzir a peroxidação de lipídios de membrana causada por ERO's, promoveu aumento da biomassa da cultura e a maior produção de taxol, quando comparado aos tratamentos isolados (YU et al., 2001).

A avaliação do comportamento metabólico de plantas sob cultivo em campo frente a elicitores é importante para que sejam identificados fatores que incrementem o rendimento de compostos de interesse em culturas de plantas medicinais. Com isso, é possível o desenvolvimento de práticas de cultivo viáveis em que podem ser utilizados elicitores para intensificar a produtividade e melhorar a qualidade de plantas medicinais cultivadas,

viabilizando a produção de matéria prima em larga escala como insumo para indústrias de medicamentos (GORELICK & BERNSTEIN, 2014).

Plantas de *Echinacea purpurea* L. cultivadas em campo e pulverizadas por dois anos com diferentes concentrações de ácido salicílico, seus derivados ácido acetilsalicílico e metil salicilato, e ascorbato de titânio (IV) apresentaram aumentos expressivos na produção de biomassa e dos compostos ativos ácido cicórico, ácido caftárico e ácido clorogênico. O ácido salicílico apresentou os melhores resultados para quase todos as variáveis estudadas, sendo justificado por sua função na sinalização de defesa nas plantas (KUZEL et al., 2009).

Resultados semelhantes foram obtidos em plantas de *Rauwolfia serpentina* Benth. cultivadas em vasos e pulverizadas uma única vez com três concentrações de ácido salicílico, ácido acetilsalicílico e metil jasmonato. O peso seco tanto das raízes quanto da parte aérea apresentou aumento com a aplicação de todos os elicitores. Entretanto, o elicitor que em geral promoveu as maiores concentrações dos ácidos fenólicos ácido cicórico, ácido caftárico, ácido clorogênico e ácido cafeico e também do flavonoide rutina nesta espécie foi o metil jasmonato, tanto nas raízes quanto na parte aérea (NAIR et al., 2013).

Plantas de *Angelica gigas* Nakai cultivadas em campo apresentaram aumento gradativo em relação às plantas controle na produção de biomassa por planta e na acumulação de decursina e de decursinol angelato nas raízes quando receberam tratamento com extrato de levedura combinado ao íon  $Cu_2^+$ , derramado no solo ao redor das raízes. Este tratamento foi selecionado em testes *in vitro* com culturas de raízes desta espécie e, segundo os autores, plantas tratadas com esta combinação de elicitores apresentaram acumulação de decursinol angelato 2,5 vezes maior do que o esperado a partir dos testes *in vitro*, quando completaram quatro meses de idade (RHEE et al., 2010). Esta informação pode indicar que a produção de metabólitos secundários no cultivo em campo pode ser uma alternativa melhor que o cultivo *in vitro*, para algumas espécies.

Diante de exposto, observa-se que tão importante quanto identificar propriedades biológicas e farmacológicas em plantas é levantar as possíveis variações químicas e suas consequências biológicas. Com esses conhecimentos em mãos, a prospecção de plantas torna-se mais viável, principalmente para fins terapêuticos.

## REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.
- ALBORN, H. T. et al. An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. **Science**, v. 276, n. 5314, p. 945-949, 1997.
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007.
- BEDOYA, O. A. et al. Actividad inhibitoria del aceite esencial de *Lippia origanoides* HBK sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans*. **Acta Agronómica**, v. 64, n. 2, p. 116-124, 2014.
- BETANCOURT, L. et al. Efecto de diferentes niveles de aceites esenciales de *Lippia origanoides* Kunth en pollos de engorde. **Revista MVZ Córdoba**, v. 17, n. 2, p. 3033-3040, 2012.
- BETANCUR-GALVIS, L. et al. Antifungal, cytotoxic and chemical analyses of essential oils of *Lippia origanoides* HBK grown in Colombia. **Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud**, v. 43, n. 2, p. 141-148, 2011.
- BLANK, A. F. et al. Chemical Diversity in *Lippia alba* (Mill.) NE Brown Germplasm. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 1-11, 2015.
- BOTELHO, M. A. et al. Nanotechnology in Phytotherapy: Antiinflammatory Effect of a Nanostructured Thymol Gel from *Lippia sidoides* in Acute Periodontitis in Rats. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 1, p. 152-159, 2016.
- BRUCE, R. J.; WEST, C. A. Elicitation of casbene synthetase activity in castor bean The role of pectic fragments of the plant cell wall in elicitation by a fungal endopolygalacturonase. **Plant Physiology**, v. 69, n. 5, p. 1181-1188, 1982.
- CARVALHO, A. F. U. et al. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 569-571, 2003.
- CASTRO, R. A.; ALBIERO, A. L. M. O mercado de matérias primas para indústria de fitoterápicos. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 10, n. 1, p. 59-72, 2016.
- CELIK TAS, O. Y. et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 553-559, 2007.
- COELHO, A. G. et al. Optimization and standardization of extraction method from *Lippia origanoides* HBK: Focus on potential anti-hypertensive applications. **Industrial Crops and Products**, v. 78, p. 124-130, 2015.
- ESCOBAR, P. et al. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp. essential oils and their major components. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 184-190, 2010.
- FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, n. 4, p. 213-226, 2008.
- GIULIETTI, A. M.; CONCEICAO, A.; QUEIROZ, L. P. **Diversidade e caracterização das fanerógamas do Semi-árido brasileiro**. Recife: Associação das Plantas do Nordeste, 2006. 488p.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.
- GORELICK, J.; BERNSTEIN, N. Elicitation: an underutilized tool for the development of medicinal plants as a source for therapeutic secondary metabolites. In: SPARKS, D. L. **Advances in Agronomy**. Londres: Academic Press, v. 124, 2014, p. 201-230.
- GOVAERTS, R.; ATKINS, S. **World Checklist of Verbenaceae**. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em: <[http://apps.kew.org/wcsp/synonymy.do?name\\_id=113656](http://apps.kew.org/wcsp/synonymy.do?name_id=113656)>. Acesso em: 07/03/2016.
- HU, X. et al. Calcium-calmodulin is required for abscisic acid-induced antioxidant defense and functions both upstream and downstream of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in leaves of maize (*Zea mays*) plants. **New Phytologist**, v. 173, n. 1, p. 27-38, 2007.
- HUSSAIN, A. I. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 986-995, 2008.
- HUSSAIN, A. I. et al. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n.

11, p. 1827-1836, 2010.

JUDD, W. S.; LUCHSINGER, A. E. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Sunderland, Mass: Sinauer Associates, 2007. 565p.

KOMARAIHAH, P. et al. Elicitor enhanced production of plumbagin in suspension cultures of *Plumbago rosea* L. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 5, p. 634-639, 2002.

KUZEL, S. et al. Elicitation of pharmacologically active substances in an intact medical plant. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 17, p. 7907-7911, 2009.

MACHADO, M. et al. Anti-Giardia activity of phenolic-rich essential oils: effects of *Thymbra capitata*, *Origanum virens*, *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*, and *Lippia graveolens* on trophozoites growth, viability, adherence, and ultrastructure. **Parasitology research**, v. 106, n. 5, p. 1205-1215, 2010.

MELLERSH, D. G. et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant–fungal interactions. **The Plant Journal**, v. 29, n. 3, p. 257-268, 2002.

MENESES, R. et al. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication *in vitro*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2009.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Tecmedd, 2004. 116 p.

MUNIR, A. A. A taxonomic revision of the genus *Lippia* [Houst. ex] Linn.(Verbenaceae) in Australia. **Journal of the Adelaide Botanic Garden**, v. 15, n. 2, p. 129-145, 1993.

NAIR, V. D. et al. Elicitation of pharmacologically active phenolic compounds from *Rauvolfia serpentina* Benth. Ex. Kurtz. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 406-415, 2013.

O'LEARY, N. et al. Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbenaceae) using the phylogenetic species concept. **Botanical Journal of the Linnean society**, v. 170, p.197-219, 2012.

OLIVEIRA, D. R. et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v. 101, p. 236–240, 2007.

OLIVEIRA, D. R. et al. Ethnopharmacological studies of *Lippia organoides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 2, p. 206-214, 2014.

OLIVERO-VERBEL, J.; GUEETTE-FERNANDEZ, J.; STASHENKO, E. Acute toxicity against *Artemia franciscana* of essential oils isolated from plants of the genus *Lippia* and *Piper* collected in Colombia. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 8, p. 419-427, 2009.

OMBITO, J. O. et al. A review on the chemistry of some species of genus *Lippia* (Verbenaceae family). **Journal of Scientific and Innovative Research**, v. 3, n. 4, p. 460-466, 2014.

PANDELÓ, D. et al. Oil production at different stages of leaf development in *Lippia alba*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 497-501, 2012.

PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201–214, 2001.

PINTO, C. P. et al. Antimicrobial activity of *Lippia* species from the Brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-5, 2013.

RAMÍREZ, L. S. et al. Actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Lippia organoides* de diferentes orígenes de Colombia. **Ciencia**, v. 17, n. 4, 2009.

RESENDE, M. D. Antimicrobial activity of *Lippia* species from the Brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 15, p. 173-242, 2007.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003.

RHEE, H. S. et al. Enhanced accumulation of decursin and decursinol angelate in root cultures and intact roots of *Angelica gigas* Nakai following elicitation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 101, n. 3, p. 295-302, 2010.

RIBEIRO, A. F. et al. Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia organoides* Kunth. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 55, p. 249-259, 2014.

- SALIMENA, F. R. G. et al. Verbenaceae. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. (Orgs.) **Livro vermelho da flora do Brasil**. CNCFlora, Centro Nacional de Conservação da Flora, 2013. p. 1010-1017.
- SANTOS, A. et al. Uso popular de espécies medicinais da família Verbenaceae no Brasil. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 17, n. 4, supl. 2, p. 980-991, 2015.
- SANTOS, H. S. et al. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR Application to structure elucidation of prenylated naphthoquinone dimers from *Lippia microphylla*. **An Ressonância Magn Nucl.**, v. 1, n. 1, p. 32-36. 2002.
- SANTOS, H. S. et al. Cytotoxic Naphthoquinones from Roots of *Lippia microphylla* Cham. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v. 58, p. 5117-5120, 2003.
- SANTOS, I. G. A. et al. Amebicidal activity of the essential oils of *Lippia* spp. (Verbenaceae) against *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. **Parasitology research**, v. 115, n. 2, p. 535-540, 2016.
- SARRAZIN, S. L. F. et al. Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia origanoides* Kunth. **Lipids in health and disease**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2015.
- SHARAN, M. et al. Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures. **Plant Science**, v. 132, n. 1, p. 13-19, 1998.
- SILVA, M. M. et al. A. Variação de timol e carvacrol em *Lippia microphylla* Cham. ao longo do dia. In: 32<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. **Anais eletrônicos...** Fortaleza: SBQ. 2009. Disponível em: <sec.s bq.org.br/cdrom/32ra/resumos/T1075-1.pdf>. Acesso em: 09/11/2009.
- SIMÕES, E. R. B. et al. Biomedical properties and potentiality of *Lippia microphylla* Cham. and its essential oils. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 4, n. 3, p. 256-263, 2015.
- STASHENKO, E. E. et al. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **Journal of separation science**, v. 33, n. 1, p. 93-103, 2010.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p
- TEIXEIRA, M. L. et al. Essential Oils from *Lippia origanoides* Kunth. and *Mentha spicata* L.: chemical composition, insecticidal and antioxidant activities. **American Journal of Plant Sciences**, v. 2014, p. 1181-1190, 2014.
- TELES, S. et al. *Lippia origanoides* HBK essential oil production, composition, and antioxidant activity under organic and mineral fertilization: Effect of harvest moment. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 217-225, 2014.
- TURLINGS, T. C. et al. An elicitor in caterpillar oral secretions that induces corn seedlings to emit chemical signals attractive to parasitic wasps. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, n. 3, p. 411-425, 1993.
- VÁSQUEZ, S. P. F.; MENDONÇA, M. S.; NODA, S. N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 44, n. 4, p. 457-472, 2014.
- VERA, S. S. et al. Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology research**, v. 113, n. 7, p. 2647-2654, 2014.
- VICUÑA, G. C.; STASHENKO, E. E.; FUENTES, J. L. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. **Fitoterapia**, v. 81, n. 5, p. 343-349, 2010.
- XAVIER, A. L. et al. Chemical composition, antitumor activity, and toxicity of essential oil from the leaves of *Lippia microphylla*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 70, n. 5-6, p. 129-137, 2015.
- YU, L. J. et al. Effects of salicylic acid on fungal elicitor-induced membrane-lipid peroxidation and taxol production in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 477-482, 2001.
- ZHAO, J.; DAVIS, L.C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 283-333, 2005.

## **CAPÍTULO 2**

### **COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides* KUNTH. SOB ELICITAÇÃO**



## 2 CAPÍTULO: COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia organoides* SOB ELICITAÇÃO

### RESUMO

*Lippia organoides* Kunth é uma planta medicinal produtora de óleo essencial com ampla ação antimicrobiana, no entanto, a produção de terpenos voláteis pode variar a depender das condições ambientais. A ativação do metabolismo de defesa da planta por elicitores pode garantir alta produtividade e atividade biológica. Este trabalho objetivou avaliar o efeito de elicitores sobre a produção, composição e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. organoides*. Para isso, plantas cultivadas em campo foram pulverizadas com suspensões de material celular dos fungos *Aspergillus niger* (AN) e *Fusarium oxysporum* (FO), solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,5 M (SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e água destilada (CT). O óleo essencial de folhas (OEF) e de inflorescências (OEI) secas foi obtido por hidrodestilação e o volume foi usado no cálculo da porcentagem (%OE) e do rendimento relativos ao peso do material vegetal. A composição foi determinada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e a atividade antimicrobiana por microdiluição em caldo contra *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Staphylococcus*. Os tratamentos não alteraram a produção e a composição de OEF. O SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elevou a produção do OEI. O OEF conteve carvacrol, *p*-cimeno,  $\gamma$ -terpineno e *E*-cariofileno como compostos majoritários e OEI apresentou ainda linalool como segundo mais abundante. FO aumentou a proporção de biciclogermacreno no OEI. Todos os tratamentos tenderam a aumentar a atividade do OEF e OEI contra *C. albicans* e *S. aureus* e a reduzir contra *E. coli*. Estes resultados mostram que a pulverização de SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, FO e AN pode promover a elicitação da produção de terpenoides voláteis com atividade antimicrobiana, revelando uma função ecofisiológica de proteção do OE para *L. organoides*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Planta medicinal. Estimulação metabólica. Terpenoides voláteis. Biciclogermacreno. Atividade antimicrobiana.

### ABSTRACT

*Lippia organoides* Kunth is a medicinal herb that produces essential oil with wide antimicrobial activity, but the production of volatile terpenes would vary depending on the environment conditions. The activation of plant defense metabolism by elicitors may ensure high productivity and biologic activity. Therefore, this work aimed to evaluate the effect of elicitors on the essential oil production, composition and antimicrobial activity of *L. organoides*. To this end, field cultivated plants were sprayed with cell material suspensions of *Aspergillus niger* (AN) and *Fusarium oxysporum* (FO), hydrogen peroxide solution (SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and distilled water (CT). The essential oils of dry leaves (LEO) and inflorescence (IEO) were hydrodistilled, and the volume were used to calculate the essential oil percentage (EO%) and yield corresponding to the plant weight. The composition was determined through gas chromatography coupled to mass spectrometry, and the antimicrobial activity was determined by broth microdilution against *Escherichia coli*, *Candida albicans* and *Staphylococcus*. The treatments did not modify the LEO production and composition. SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> raised the IEO production. The LEO majority compounds were carvacrol, *p*-cymene,  $\gamma$ -terpinene and *E*-caryophyllene, and the IEO had linalool as second most abundant compound. FO increased the IEO bicyclogermacrene content. All elicitors tended to increase the antimicrobial activity against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*, and to reduce the activity against *Escherichia coli*. These results show that SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, FO and AN spray could promote the elicitation of antimicrobial volatile terpenoids production, revealing an ecoophysiological function of

protection for EO of *L. origanoides*.

**KEY WORDS:** Medicinal plant. Metabolic elicitation. Volatile terpenoids. Bicyclogermacrene. Antimicrobial activity.

## 2.1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana é conhecida desde o início do consumo de antibióticos, no entanto, com as contínuas descobertas de novas classes e ativos ainda mais potentes, este fenômeno foi menosprezado a até poucas décadas atrás. Estima-se que os custos extra dos atendimentos hospitalares com os casos de resistência bacteriana nos Estados Unidos sejam de 55 bilhões de dólares por ano. Todavia, levando-se em conta que o uso profilático destes medicamentos é prática padrão em grande parte dos procedimentos hospitalares, o custo da ausência de antibióticos eficazes seria muito maior, sem contar o aumento dos índices de morbidade e mortalidade dos pacientes (SMITH & COAST, 2013).

Entre as infecções fúngicas, aquelas provocadas por *Candida* sp. são as mais frequentes, estando entre as quatro principais infecções hospitalares. *C. albicans* responde por 50 a 70% dos casos de infecção invasiva atribuída ao gênero (ZARDO & MEZZARI, 2004). Nos últimos 20 anos os casos deste tipo de infecção vêm aumentando ao mesmo tempo em que cresce a resistência aos antifúngicos (CASTRO et al., 2006). O surgimento de cepas de micro-organismos resistentes está associado ao aumento do consumo e à administração de medicamentos inespecíficos, muitas vezes com objetivo profilático, causando redução das possibilidades terapêuticas disponíveis (ZARDO & MEZZARI, 2004; VELDHUIZEN et al., 2006).

Os óleos essenciais vêm mostrando grande potencial como matéria prima para novos antimicrobianos. Eles são formados por uma mistura de terpenoides e fenilpropanoides voláteis, sintetizados nas vias do mevalonato e chiquimato, respectivamente. Estudos vêm demonstrando a elevada atividade de seus constituintes, isolados ou em mistura, contra amplo espectro de micro-organismos patogênicos (PINTO et al., 2013).

*Lippia origanoides* Kunth. é um arbusto medicinal aromático nativo utilizado popularmente no tratamento de distúrbios gastrointestinais e respiratórios e como antisséptico bucal e tópico. Seu óleo essencial apresenta atividade antiprotozoárias (ESCOBAR et al., 2010), anti-helmíntica (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007), carrapaticida (CHAGAS et al., 2016) e potentes e amplas ações antibacteriana (SARRAZIN et al., 2015) e antifúngica (BETANCUR-GALVIS et al., 2011), além de várias outras atividades biológicas. Entretanto, o

conteúdo e composição de óleo essencial podem apresentar variações a depender de fatores ambientais do local de crescimento (SILVA et al., 2009; SANTANA et al., 2015).

Os óleos essenciais são metabólitos secundários, os quais são sintetizados nas plantas, entre outras funções ecológicas, para fins de defesa contra herbívoros e micro-organismos patógenos e de adaptação a condições edafoclimáticas adversas (STANGARLIN et al., 2011).

Pesquisas vem sendo realizadas a fim de serem estabelecidas técnicas que explorem essas relações ecofisiológicas das plantas com seu meio. Um dos métodos desenvolvidos é a elicitação, que consiste na estimulação da produção de metabólitos secundários de interesse através da ativação dos mecanismos de defesa da planta por agentes físicos, químicos ou biológicos. Assim, este procedimento pode ser uma ferramenta válida na produção de plantas medicinais em larga-escala, melhorando a qualidade e a produtividade (GORELICK & BERNSTEIN, 2014). Entretanto, para cada espécie são necessários estudos aprofundados para se determinar quais elicitores devem ser empregados, bem como os efeitos sobre a produção de compostos ativos e as atividades biológicas da planta medicinal.

Neste contexto, o presente trabalho objetivou analisar os efeitos da aplicação de elicitores sobre a produção, composição e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *L. origanoides*.

## 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido conforme esquema disposto na figura 2.1.

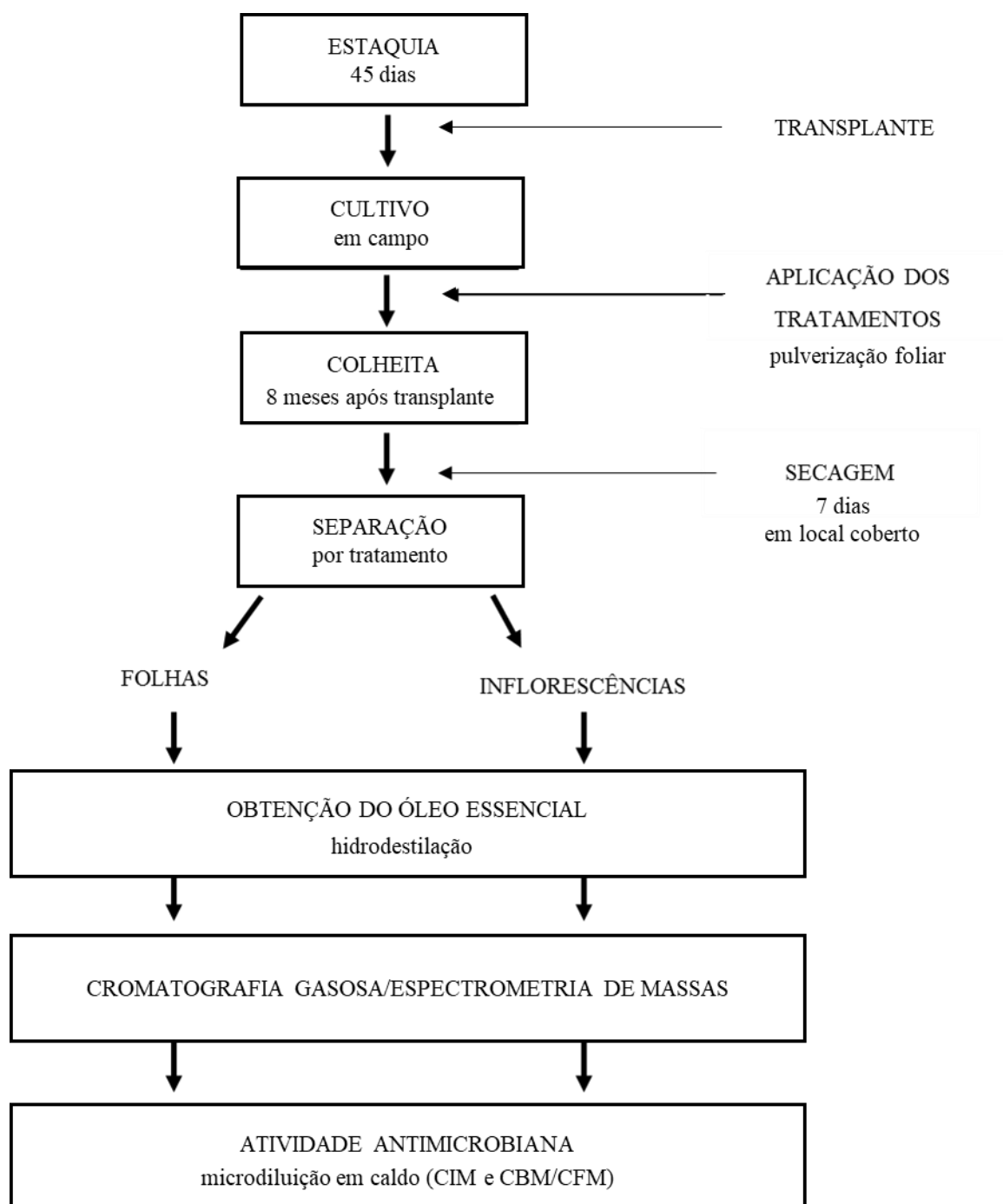


Figura 2.1- Esquema experimental.

### **2.2.1 Propagação das plantas de *L. origanoides***

A propagação das plantas de *L. origanoides* foi realizada na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (Bahia). Do local, foram obtidas as plantas matrizes para a produção das mudas (HUEFS 83.373). Estacas apicais foram confeccionadas com cerca de 12 cm de altura e 2 cm da base desfolhados. Em seguida, foram imersas por 24 horas em solução de ácido indolbutírico na concentração de 278 mg/L, a fim de estimular o enraizamento. Por fim, foram cultivadas em bandejas de poliestireno expandido com 200 poços preenchidos com mistura de vermiculita expandida de granulometria fina e substrato comercial Biomix<sup>®</sup> na proporção de 1:1. Durante 45 dias, permaneceram em casa de vegetação com irrigação diária e nebulização intermitente (SILVA, 2012).

### **2.2.2 Cultivo das plantas em campo**

As mudas produzidas foram transplantadas para covas individuais no campo do próprio Horto Florestal. As covas haviam sido anteriormente preenchidas com terra vegetal e esterco bovino na proporção de 5:1 e fertilizante superfosfato simples (18% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) na proporção de 1 kg por m<sup>3</sup> da mistura. A necessidade de adição de fósforo e de adubo orgânico se deveu à baixa concentração de fósforo e de matéria orgânica nos solos nordestinos (MENEZES et al., 2012). As plantas permaneceram sob cultivo de maio a dezembro de 2013, com irrigação diária.

### **2.2.3 Produção das suspensões elicitoras de material celular de fungos**

Os fungos filamentosos fitopatógenos das espécies *Fusarium oxysporum* (Figura 2.2A) e *Aspergillus niger* (Figura 2.2B) foram disponibilizados pelo Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Recôncavo Baiano – Cruz das Almas. O cultivo dos fungos foi realizado segundo metodologia padronizada no próprio laboratório. O meio utilizado foi o BDA (Dfco<sup>™</sup> Batata Dextrose Agar), preparado com 19,5 g de BDA dissolvido em 0,5 L de água destilada. Os fungos foram inoculados em sete placas de Petri cada e incubados por 72 horas em estufa de crescimento a 28 °C.

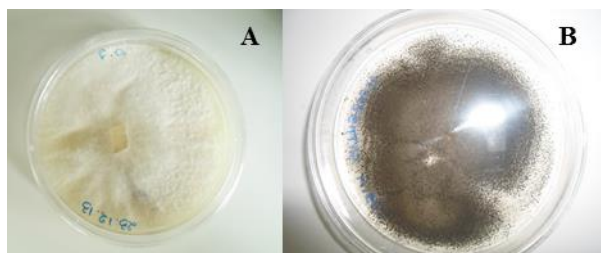


Figura 2.2- Culturas de *Fusarium oxysporum* (A) e *Aspergillus niger* (B) utilizadas.

As placas foram encaminhadas ao Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos (Lapron) da Universidade Estadual de Feira de Santana. Para o preparo das suspensões, foram aplicados 10 mL de água destilada por placa e realizada a raspagem das estruturas superficiais do fungo com o auxílio de alça metálica. As suspensões celulares das sete placas / espécie foram reunidas em um frasco de vidro com tampa, esterilizadas em autoclave a 121 °C e 1 atm por 20 minutos. Em seguida, foram levadas ao ultrassom por 30 minutos, para promover a lise celular, e mantidas em geladeira a 2 °C. O volume de suspensão obtido para cada fungo (70 mL) foi dividido em quatro partes de 17,5 mL, para as quatro aplicações. No dia da aplicação, diluiu-se 17,5 mL de suspensão em água destilada, avolumando-se para 1 L de suspensão final.

#### 2.2.4 Aplicação dos tratamentos e colheita das plantas do campo

Ao longo do mês de dezembro de 2013, foram realizadas quatro aplicações dos tratamentos com intervalos de sete dias. Neste período, as plantas encontravam-se em fase de floração. Por aplicação, foram pulverizados 100 mL/planta/tratamento, que consistiu no volume suficiente para molhar as folhas. Os tratamentos testados foram:

- AN: suspensão de material celular de *Aspergillus niger*;
- FO: suspensão de material celular de *Fusarium oxysporum*;
- SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 0,5 M;
- CT: água destilada (controle).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo sorteadas duas plantas por repetição e quatro repetições por tratamento, totalizando 32 plantas.

Sete dias após a última aplicação, as partes aéreas das plantas foram colhidas pela manhã. O material foi agrupado por repetição e mantido em galpão coberto e arejado para secagem durante sete dias. Folhas e inflorescências foram separadas e levadas ao Lapron para a obtenção dos óleos essenciais.

A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizada foi determinada com base nos resultados obtidos por

León et al. (1995). Em seu trabalho, a injeção de soluções de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no limbo foliar de plantas de tabaco, com o uso de uma seringa, proporcionou aumento dose-dependente do conteúdo de ácido salicílico, sinalizador de defesa vegetal, e de ácido benzoico, precursor de ácidos antioxidantes. Segundo os autores, até a concentração de 0,5 M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não houve danos celulares visíveis. Desta forma, optou-se por usar 0,5 M, a maior concentração atribuída como segura para a planta.

### 2.2.5 Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais das folhas e inflorescências foram obtidos separadamente, totalizando 32 amostras (4 tratamentos x 4 repetições x 2 órgãos). Na obtenção dos óleos essenciais utilizou-se a metodologia descrita por Teles et al. (2014) com poucas modificações. O material vegetal seco (droga vegetal) foi pesado, triturado em liquidificador com água destilada (50 g/ 1,5 L) e levado ao aparelho de hidrodestilação do tipo Clevenger por três horas. O volume de óleo essencial foi medido e retirado com pipeta de Pasteur de vidro. A umidade residual foi retirada com sulfato de sódio anidro. Após filtração com algodão, o óleo essencial foi pesado em balança analítica. As amostras foram armazenadas em frascos de vidro revestidos com papel alumínio e mantidos em refrigerador a cerca de -5 °C. Para obter o teor de umidade (U%) da droga vegetal, 1,0 g de material foi colocado em balança de infravermelho à 105 °C.

O rendimento (mL/kg), ou seja, o volume de óleo essencial (OE) obtido a partir da massa de droga vegetal (DV), foi calculado pela equação:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{OE (mL)}}{[\text{DV (kg)} - (\text{DV (kg)} \times \text{U\%/100})]}.$$

E a porcentagem de óleo essencial (%OE) foi calculada em mL de OE por 100g de droga vegetal (TELES et al., 2014):

$$\% \text{OE} = \frac{\text{OE (mL)}}{[\text{DV (g)} - (\text{DV (g)} \times \text{U\%/100})]} \times 100$$

### 2.2.6 Análise dos componentes dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram analisados em Cromatógrafo a Gás modelo CG-2010 da Shimadzu<sup>®</sup> acoplado a Espectrômetro de Massas GC/MS-QP 2010 da Shimadzu<sup>®</sup>, injetor automático AOC-20i e coluna capilar fundida com fase BPX5 (30 m x 0,25 m, 2,25 µm) com

temperatura de forno variando de 60 a 240 °C na velocidade de 3 °C/min. Utilizou-se temperatura do injetor de 220 °C, da interface do CG e da fonte de ionização de 240 °C, energia de ionização de 70 eV, corrente de ionização de 0,7kV e fluxo de gás de arraste (hélio) de 1,0 mL/min. O volume injetado foi de 0,2 µL a 20 µg OE/mL de diclorometano e com split de 1:20.

Cada pico do cromatograma foi identificado pelo seu espectro de massas, em comparação com a biblioteca do equipamento (Wiley Nist 21 e Nist 72), e pelo Índice de Kovats. O Índice foi calculado a partir dos dados obtidos da injeção de uma série homóloga de n-alcenos (C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub>), sendo posteriormente comparado ao da literatura (ADAMS, 2007). A quantificação dos constituintes identificados, em relação percentual, foi calculada com base nas áreas dos picos cromatográficos correspondentes pelo método da normalização.

### 2.2.7 Determinação das concentrações inibitória e microbicida mínimas

A influência dos elicitores sobre a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi avaliada através do teste de diluição seriada em caldo. Os testes de sensibilidade para bactérias e para leveduras foram desenvolvidos conforme normas estabelecidas pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais, Clinical and Laboratory Standards Institute, (CLSI, 2012a; 2012b), com modificações com modificações. As cepas utilizadas foram obtidas da Coleção de Culturas de Micro-organismos da Bahia (CCMB) da UEFS e mantidas no setor de microbiologia do Lapron (Quadro 2.1).

Quadro 2.1- Micro-organismos utilizados no experimento.

Classe	Espécie/Cepa	Resistência
Bactéria gram-negativa	<i>Escherichia coli</i> CCMB261	Resistente a sulfonamida
Bactéria gram-positiva	<i>Staphylococcus aureus</i> CCMB263	Resistente a novobiocina
Levedura	<i>Candida albicans</i> CCMB286	Resistente a fluconazol e anfotericina B

As bactérias e a levedura usadas no preparo dos inóculos foram repicadas 24 e 48 horas antes, respectivamente. As bactérias foram cultivadas em placas de Petri contendo meio de cultura Müeller–Hinton Agar (MHA) composto por 12 g de Agar Agar Himedia® e 21 g de meio Müeller–Hinton (MH) Himedia® por litro de água destilada, e mantidas em estufa de crescimento com circulação de ar a 36 °C. A levedura foi cultivada em placa de Petri contendo meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) Himedia® 65 g/L e mantidas em estufa de crescimento circulação de ar a 28 °C.



O inóculo foi preparado adicionando-se, com o uso de alça microbiológica, uma quantidade de micro-organismo a 5 mL de solução salina a 0,45%. A concentração foi ajustada para se atingir  $1 \times 10^8$  UFC/mL para bactéria e  $1 \times 10^6$  UFC/mL para levedura (suspensão Mcfarland 0,5). Este valor foi obtido através de agitação em Vortex® e leitura da absorbância da suspensão em colorímetro Biochrom® a 580 nm, correspondendo a 0,1-0,11 nm para *E. coli*, 0,1 nm para *S. aureus* e 1-0,95 nm para *C. albicans*. Uma nova diluição foi realizada adicionando-se 1 mL da suspensão em 9 mL de solução salina 0,45%, obtendo-se inóculo contendo  $1 \times 10^7$  UFC/mL para bactéria e  $1 \times 10^5$  UFC/mL para levedura.

Um “pool” contendo cerca de 50 µL do óleo essencial de cada repetição/órgão/tratamento foi preparado para que fosse viável a comparação entre os tratamentos (Figura 2.3). Desta forma, foram testadas quatro amostras de óleo essencial de folhas e quatro de inflorescência, correspondendo aos quatro tratamentos. Foram preparados 2 mL de soluções de óleo essencial a 20 µL/mL em Tween 80 a 5% e filtradas em membrana Puradisc™ de polietersulfona estéril com poro de 0,2 µm.

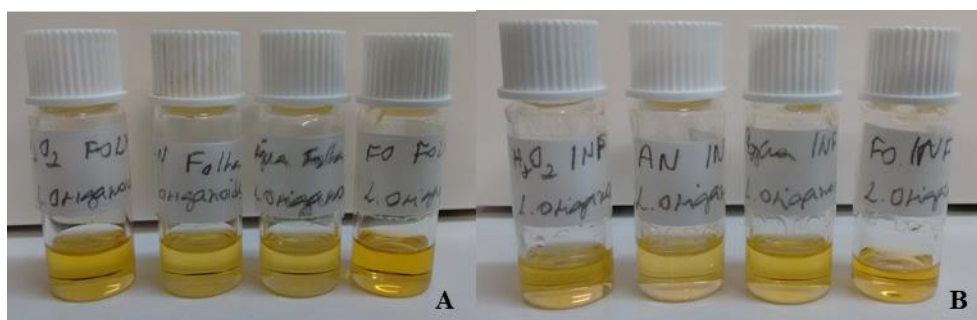


Figura 2.3- Amostras de óleo essencial de folhas (A) e inflorescências (B) de *L. origanoides* sob diferentes tratamentos.

A partir desta solução foi realizada diluição seriada em microplaca com 96 poços com fator de diluição de 1:1 (Figura 2.4), compreendendo de 9,5 a 0,074 µL/mL. Para tanto, adicionou-se no primeiro poço 95 µL de meio MH a 42 g/L e 95 µL da solução de óleo essencial. Nos demais poços adicionou-se 95 µL de meio MH a 21 g/L. Após, homogeneização, 95 µL foram retirados do primeiro poço e adicionados ao segundo, e assim sucessivamente até o último poço da coluna. No final, 95 µL foram retirados do último poço e descartados. Ao término da diluição todos os poços continham volume de 95 µL com mesma concentração de meio e concentrações decrescentes de óleo essencial. Foram então adicionados 5 µL de inóculo por poço, completando volume total de 100 µL contendo  $5 \times 10^5$  UFC/mL para bactéria e  $5 \times 10^3$  UFC/mL para a levedura (Figura 2.4).

No controle positivo para as bactérias, foi utilizada solução de cloranfenicol (Sigma) a 6 mg/mL. A diluição seriada do cloranfenicol compreendeu à faixa de concentração de 300 – 2,3 µg/mL. Para o controle positivo para a levedura, foi utilizada solução de 2 mg/mL de nistatina (Neo química), com diluição seriada entre 100 e 0,78 µg/mL. Para avaliar a sensibilidade microbiana ao Tween 80, foi realizada diluição da solução de Tween usada para diluir os óleos essenciais na faixa de 2,38% a 0,02%. Cada microplaca conteve controles negativos das soluções de óleo essencial (100 µL), do meio MH a 42 g/L (100 µL), do meio MH a 21 g/L (100 µL) e do micro-organismo (95 µL de meio MH a 21 g/L + 5 µL de inóculo) (Figura 2.4). As placas foram inoculadas a 37° C para as bactérias e 28° C para a levedura em estufa de crescimento com circulação de ar, por 24 e 48 horas, respectivamente. Cada concentração e os controles apresentaram três poços por placa. Como repetições foram feitas três placas iguais.

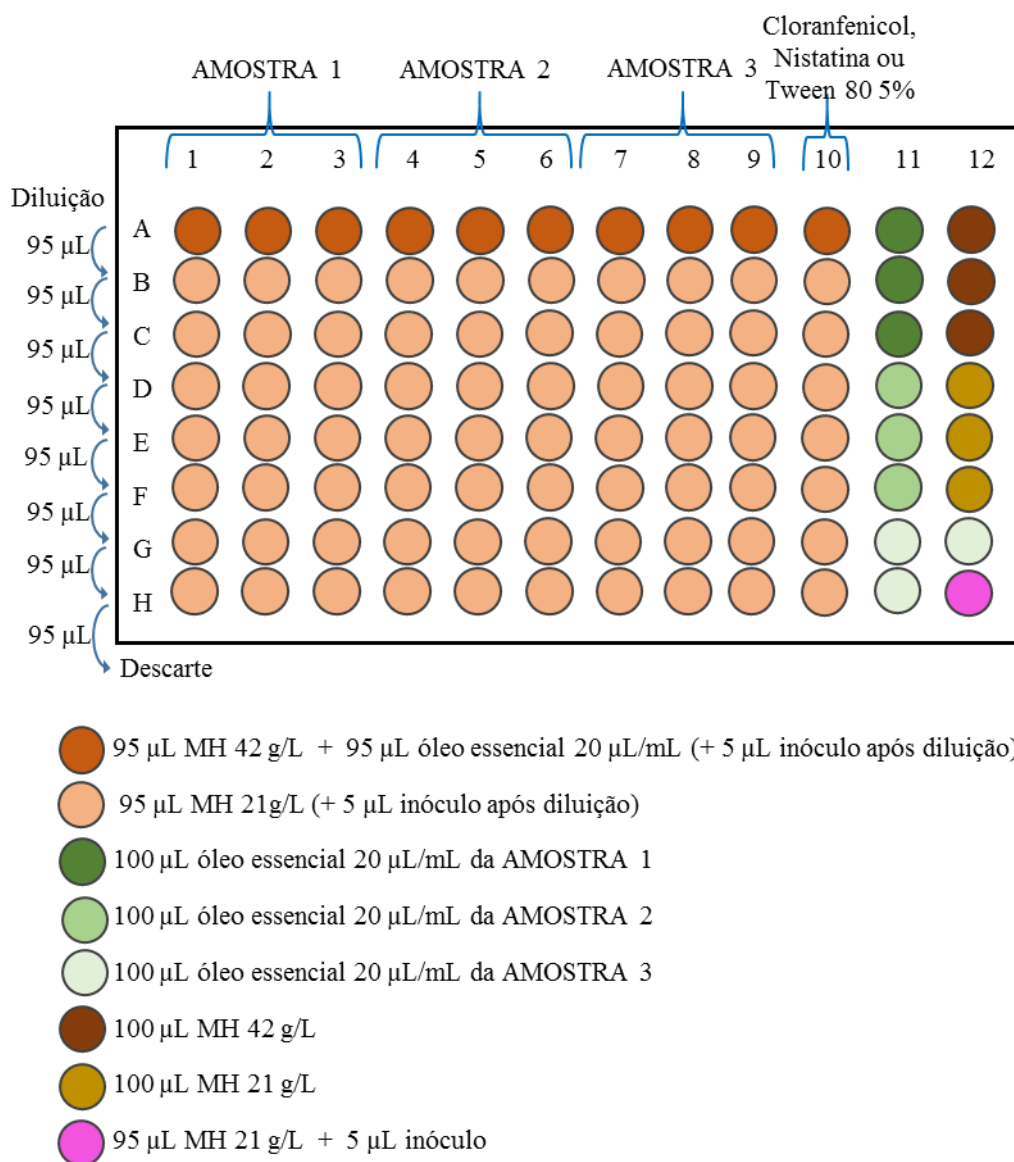


Figura 2.4- Esquema do teste de sensibilidade microbiana por microdiluição em caldo.

Após o período de incubação, a cada poço foram adicionados 30 µL de resazurina estéril a 0,02% (m/v), que possui cor azul. Em seguida, as placas foram incubadas novamente por três horas. Nos poços com crescimento microbiano, a resazurina é reduzida em resorufina, composto de cor rosa. A concentração inibitória mínima foi aquela correspondente à menor concentração que manteve a color azul em cada coluna, como mostra a figura 2.5A (SARRAZIN et al., 2015).

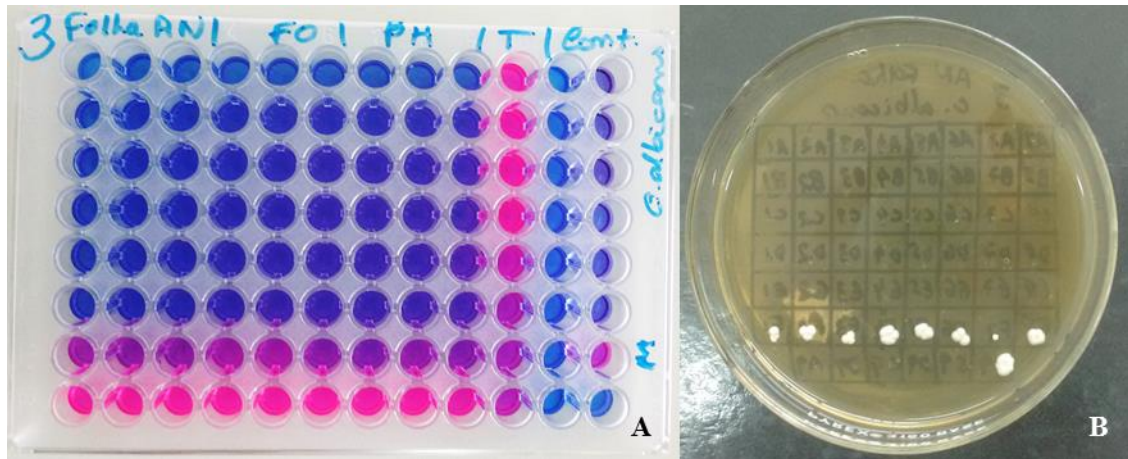


Figura 2.5- Microplaca do teste de sensibilidade microbiana após revelação com resazurina (A) e placa de Petri inoculada com os conteúdos dos poços que permaneceram de cor azul.

Posteriormente, foram determinadas as concentrações bactericida mínima (CBM) e fungicida mínima (CFM). Após homogeneização, 1  $\mu$ l do conteúdo de cada poço que permaneceu com a cor azul foi inoculado em local previamente identificado em placas de Petri contendo meio MHA para bactérias e SDA para levedura, já descritos acima. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, para bactérias, e 28°C por 72 horas, para levedura. Após, foi determinada a CBM e CFM correspondente à menor concentração que não houve crescimento microbiano (Figura 2.5B).

### 2.2.8 Análise estatística

Para a análise de variância do rendimento, da porcentagem e da composição dos óleos essenciais foi utilizado o teste F e a comparação entre as médias dos tratamentos pelo teste de Tukey, a 95% de probabilidade, através do programa estatístico Sisvar v5.6.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Produção de óleo essencial

As inflorescências apresentaram rendimento de OE cerca de 36% maior que as folhas. Não houve diferença significativa na produção de OE das folhas entre os tratamentos. Entretanto, SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e FO promoveram aumento de 44,9% e 14%, respectivamente, do conteúdo de OE das inflorescências, entretanto, apenas SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diferiu estatisticamente do CT (Tabela 2.1).

Tabela 2.1- Rendimento e porcentagem de óleo essencial de folhas e inflorescências de *L. origanoides* submetida a pulverizações foliares com elicitores.

Tratamento	Rendimento (mL/kg)		% (v/m)	
	Folha	Inflorescência	Folha	Inflorescência
AN	33,12±1,5 <sup>a</sup>	34,6±8,9 <sup>b</sup>	3,3±0,1 <sup>a</sup>	3,5±0,9 <sup>b</sup>
FO	33,6±4,7 <sup>a</sup>	51,2±9,1 <sup>ab</sup>	3,4±0,5 <sup>a</sup>	5,1±0,9 <sup>ab</sup>
SH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	34,4±2,6 <sup>a</sup>	64,8±11,2 <sup>a</sup>	3,4±0,3 <sup>a</sup>	6,5±1,1 <sup>a</sup>
CT	37,0±4,5 <sup>a</sup>	44,9±5,0 <sup>b</sup>	3,7±0,4 <sup>a</sup>	4,5±0,5 <sup>b</sup>
Média	34,5±3,5 <sup>B</sup>	48,9±13,8 <sup>A</sup>	3,4±0,3 <sup>B</sup>	4,9±1,4 <sup>A</sup>
C.V. (%)	10,36	18,10	10,36	18,10

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não possuem diferença significativa, segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). C.V.: coeficiente de variação; AN: *Aspergillus niger*; FO: *Fusarium oxysporum*; SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; CT: controle (água destilada).

A porcentagem de OE das folhas obtida está entre os valores encontrados para a espécie na literatura, que varia entre 1,1% (ROJAS et al., 2006) a 5,5% (MELO et al., 2011), a depender do quimiotipo, da fase de crescimento e das condições ambientais.

O rendimento de OE mais elevado nas inflorescências pode ser justificado por diferenças na densidade de tricomas glandulares entre folhas e flores. Esta relação foi constatada por Tozin et al. (2015) em estudo com espécimes de *L. origanoides* coletadas no Cerrado. Através de microscopia eletrônica, os autores observaram densidade glandular na superfície abaxial cerca de seis vezes maior nas brácteas e sépalas e três vezes maior nas pétalas em relação às folhas. A porcentagem de OE nas inflorescências mostrou-se mais de duas vezes maior comparada com a das folhas. A maior produção de OE nas flores pode ser uma adaptação evolutiva para garantir a perpetuação da espécie, tendo em mente que esses metabólitos têm funções associadas à atração de polinizadores e à repelência de herbívoros (HELDT, 2005).

A produção de OE em diferentes espécies tem se mostrado susceptível a fatores ambientais como temperatura, luminosidade, sazonalidade, disponibilidade de água e nutrientes (MORAIS, 2009). Estes fatores têm influência sobre o metabolismo primário da planta,

alterando as taxas fotossintética e glicolítica (MORAIS, 2009), conseqüentemente, modificam a disponibilidade de moléculas necessárias às rotas do mevalonato e do deoxixilulose fosfato, como o isopentenil pirofosfato, as quais originam os precursores dos terpenoides (DEWICK, 2002). Isto foi observado por Souza et al. (2007) em plantas de *L. sidoides* (sin. de *L. origanoides*), em que a produtividade de OE foi proporcional ao aumento da incidência de radiação solar, assim como a produção de matéria seca e o diâmetro do caule. Também foi observado que o tipo e a quantidade de adubação não promoveram alteração tanto na produção de matéria seca quanto de óleo essencial em cultivos de *L. origanoides* realizados na Colômbia (ZAMBRANO et al., 2013) e no Brasil (TELES et al., 2014).

As funções ecológicas dos óleos essenciais estão muitas vezes relacionadas à defesa contra a herbivoria, ao ataque de patógenos e à resistência a outras condições estressoras (LANGENHEIM, 1994). Assim, a produção destes metabólitos também pode ser alterada pela exposição a agentes que estimulem o metabolismo de defesa das plantas, como por exemplo elicitores bióticos e abióticos (ZHAO et al., 2005).

Turlings et al. (1993) observaram esta relação entre resposta de defesa vegetal e produção de terpenoides voláteis. Em seu estudo, mudas de milho expostas a diferentes tipos de elicitores provenientes de material regurgitado de insetos herbívoros aumentaram a síntese de terpenos voláteis, quase ausentes em mudas do tratamento controle. Plantas de *L. origanoides* apresentaram aumento do teor de óleo essencial 45 dias após elicitação com ácido jasmônico e ácido acetilsalicílico, sinalizadores do metabolismo de defesa (SILVA, 2012). Em culturas de células de diferentes espécies, outros elicitores promoveram aumento do conteúdo de sesquiterpenos, como o extrato de levedura, o cloreto de cádmio e o fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani* (NAMDEO, 2007).

No experimento, o aumento da produção de óleo essencial nas inflorescências de plantas cultivadas de *L. origanoides* com a pulverização de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mostrou que os terpenos voláteis produzidos neste órgão têm função de defesa das estruturas reprodutivas. Diferente dos elicitores bióticos, o peróxido de hidrogênio é um sinalizador metabólico comum a toda reação de defesa vegetal, produzido durante a explosão oxidativa. Assim, além de sinalizar a defesa contra os diversos micro-organismos fitopatogênicos, esta ERO participa da defesa contra herbívoros e danos mecânicos que lesam as membranas plasmáticas vegetais e geram a peroxidação dos fosfolipídios (RESENDE et al., 2003). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  exógeno pode ter ativado vias de defesa contra diferentes tipos de agressores.

Por ser mais estável e sem carga, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é capaz de atravessar membranas e agir como sinalizador secundário da resposta de defesa da planta em células vizinhas. Entre outras várias

funções, ele ativa a síntese de ácido jasmônico (AJ), um hormônio relacionado à defesa que age como um fator de transcrição (ZHAO et al., 2005). Os genes ativados por este hormônio codificam enzimas das vias de síntese de fitoalexinas, que são moléculas de baixo peso molecular com função antimicrobiana. Dentre as classes de fitoalexinas ativadas pelo AJ encontram-se os terpenoides (MUELLER et al., 1993). Em *L. origanoides*, o aumento do rendimento de óleo essencial com o tratamento SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> corrobora a possível ativação dessa via de defesa.

### **2.3.2 Análise da composição dos óleos essenciais**

Óleos essenciais são misturas de compostos de baixa massa molecular, voláteis e hidrofóbicos, frequentemente pertencentes à classe dos terpenoides, os quais são formados por unidades de cadeia carbônica ramificada (Figura 2.6), isopreno (C<sub>5</sub>) (MORAIS, 2009). As unidades isoprênicas envolvidas na síntese de terpenos são os ésteres dimetilalil pirofosfato e isopentenil pirofosfato (Figura 2.6), originados das vias do mevalonato e do deoxixilulose fosfato. Os terpenoides componentes dos óleos essenciais são comumente monoterpenos (C<sub>10</sub>) e sesquiterpenos (C<sub>15</sub>) de cadeia linear, cíclica ou bicíclica que podem ser hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos ou acetatos (DEWICK, 2002).

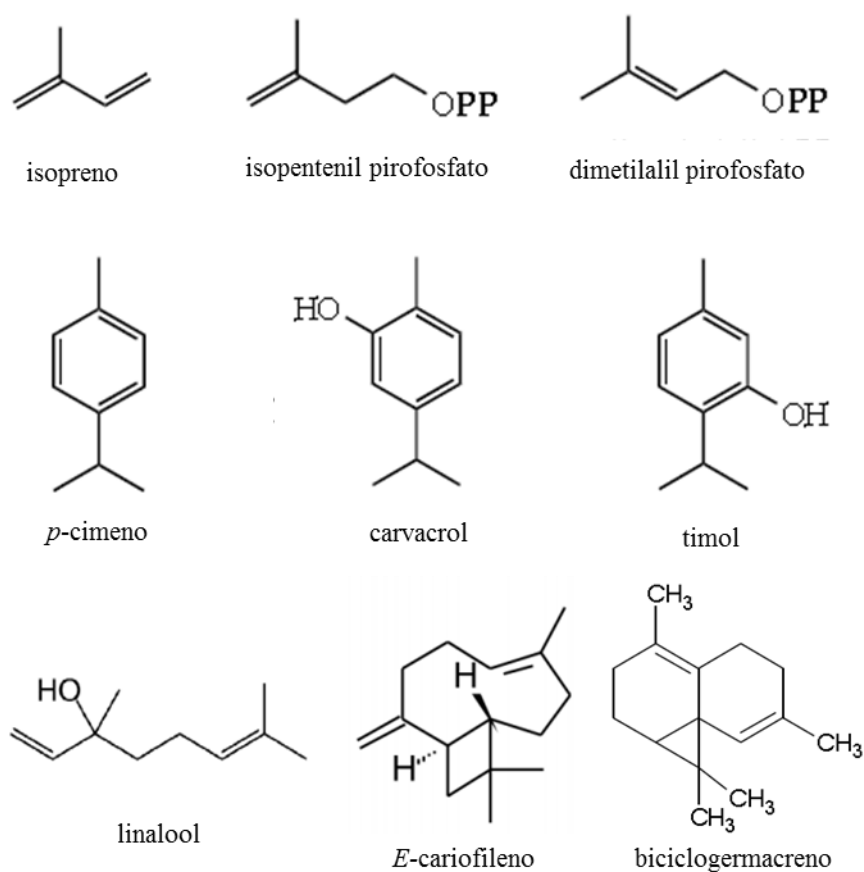


Figura 2.6- Precusores e componentes dos óleos essenciais de *L. origanoides*. Adaptado de Dewick, (2002) e Hyldgaard et al. (2012).

A partir das análises de CG/EM identificou-se como componentes majoritários do OE das folhas (Tabela 2.2) os monoterpenos carvacrol (37,56%), *p*-cimeno (18,83%),  $\gamma$ -terpineno (10,19%) e o sesquiterpeno *E*-cariofileno (6,64%), o que mostra que as plantas matrizes de *L. origanoides* utilizadas são do quimiotipo B (STASHENKO et al., 2010). Os elicitores não alteraram a composição e a concentração relativa dos compostos do OE das folhas (Tabela 2.2).



Tabela 2.2- Composição do óleo essencial (%) de folhas de *L. origanoides* submetidas a pulverização com suspensão de material celular de *Aspergillus niger* (AN) e *Fusarium oxysporum* (FO), solução de peróxido de hidrogênio (SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e água destilada (CT).

Composto	IK <sub>lit</sub>	IK <sub>calc</sub>	AN	FO	SH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	CT
$\alpha$ -Tujeno	930	930	0,86	0,73	0,83	0,72
$\alpha$ -Pinoeno	939	938	0,27	0,28	0,30	0,29
Canfeno	954	954	0,36	0,33	0,37	0,33
Mirceno	990	992	2,35	2,17	2,37	2,23
$\alpha$ -Terpineno	1020	1019	2,28	1,92	2,24	2,14
<i>p</i> -Cimeno	1026	1028	17,56	19,88	19,45	18,42
Limoneno	1029	1032	0,40	0,38	0,42	0,39
$\gamma$ -Terpineno	1064	1063	11,35	8,63	10,51	10,28
Linalool	1196	1100	1,22	1,05	1,12	1,02
Cânfora	1146	1148	0,42	0,41	0,42	0,42
Borneol	1169	1169	0,27	0,27	0,28	0,26
Terpinen-4-ol	1177	1180	0,42	0,42	0,38	0,45
Metil timil eter	1235	1238	4,31	4,76	4,59	4,53
Timol	1290	1296	1,95	1,78	1,67	1,75
Carvacrol	1299	1311	40,13	37,17	35,91	37,02
Acetato de carvacrol	1372	1376	0,24	0,27	0,23	0,23
<i>E</i> -Cariofileno	1419	1423	5,76	6,98	6,73	7,10
$\alpha$ -Bergamoteno	1434	1438	0,16	0,24	0,24	0,26
Aromadendreno	1441	1442	1,76	2,23	2,04	2,24
$\alpha$ -Humuleno	1454	1457	1,77	2,21	2,17	2,25
Biciclogermacreno	1500	1500	1,06	1,23	1,56	2,60
7-epi- $\alpha$ -Selineno	1522	1521	0,28	0,39	0,35	0,37
Espatuleno	1578	1581	0,55	0,83	0,65	0,51
Óxido de cariofileno	1583	1586	0,28	0,66	0,61	0,60
Viridiflorol	1592	1594	0,16	0,25	0,31	0,22
Total identificado			96,15	95,45	95,69	96,61

As médias na mesma linha não diferem segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O OE das inflorescências também apresentou o carvacrol (24,39%) como composto majoritário (Tabela 2.3), no entanto, em menor porcentagem em relação à das folhas. O segundo composto mais abundante foi o linalool (20,62%), seguido pelo *p*-cimeno (11,89%) e pelo  $\gamma$ -terpineno (7,38%). A composição também não sofreu variação entre os tratamentos (Tabela 2.3), entretanto, houve aumento da concentração de biciclogermacreno com a aplicação de todos os elicitores, apesar de apenas FO ter sido estatisticamente diferente do CT (Tabela 2.3; Figura 2.8).

Tabela 2.3- Composição do óleo essencial (%) de inflorescências de *L. origanoides* submetidas a pulverização com suspensão de material celular de *Aspergillus niger* (AN) e *Fusarium oxysporum* (FO), solução de peróxido de hidrogênio (SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e água destilada (CT).

Composto	IK <sub>lit</sub>	IK <sub>calc</sub>	AN	FO	SH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	CT
$\alpha$ -Tujeno	930	930	0,50	0,41	0,46	0,63
$\alpha$ -Pineno	939	938	0,39	0,34	0,36	0,42
Canfeno	954	954	1,64	1,45	1,38	1,63
Mirceno	990	992	1,60	1,41	1,52	1,65
$\alpha$ -Terpineno	1020	1019	1,57	1,27	1,43	1,58
<i>p</i> -Cimeno	1026	1028	11,05	12,26	11,95	12,32
Limoneno	1029	1032	0,74	0,67	0,68	0,72
$\gamma$ -Terpineno	1064	1063	8,45	5,95	7,28	7,85
Linalool	1196	1100	21,68	20,98	20,98	18,84
Cânfora	1146	1148	3,90	3,61	3,61	3,51
Borneol	1169	1169	0,61	0,61	0,59	0,53
Terpinen-4-ol	1177	1180	0,29	0,24	0,29	0,29
Metil timil eter	1235	1238	2,97	2,95	3,07	3,01
Timol	1290	1296	0,90	0,80	0,85	0,82
Carvacrol	1299	1311	24,53	23,90	24,33	24,82
Acetato de carvacrol	1372	1376	0,18	T	T	0,30
<i>E</i> -Cariofileno	1419	1423	4,50	5,14	4,93	4,93
$\alpha$ -Bergamoteno	1434	1438	0,45	0,59	0,48	0,58
Aromadendreno	1441	1442	1,73	2,22	2,02	2,03
$\alpha$ -Humuleno	1454	1457	1,24	1,40	1,38	1,33
Biciclogermacreno	1500	1500	4,74 <sup>ab</sup>	5,84 <sup>a</sup>	5,10 <sup>ab</sup>	3,78 <sup>b</sup>
7-epi- $\alpha$ -Selineno	1522	1521	0,38	0,58	0,47	0,43
Espatulenol	1578	1581	0,86	1,00	0,97	0,85
Óxido de cariofileno	1583	1586	0,33	0,30	0,36	0,28
Viridiflorol	1592	1594	0,36	0,39	0,35	0,30
Total identificado			95,56	94,27	94,81	93,42

Médias seguidas por letras distintas na linha diferem segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). T: traço.

A maioria dos componentes monoterpênicos detectados estão em menor concentração no OE das inflorescências em comparação com o das folhas, com exceção de canfeno, limoneno, linalool e borneol (Figura 2.7). Entre os sesquiterpenos, o *E*-cariofileno, o  $\alpha$ -humuleno e o óxido de cariofileno apresentaram maiores porcentagens nas folhas. O aromadendreno e o 7-epi- $\alpha$ -selineno não apresentaram diferença de concentrações entre os órgãos (Figura 2.7).

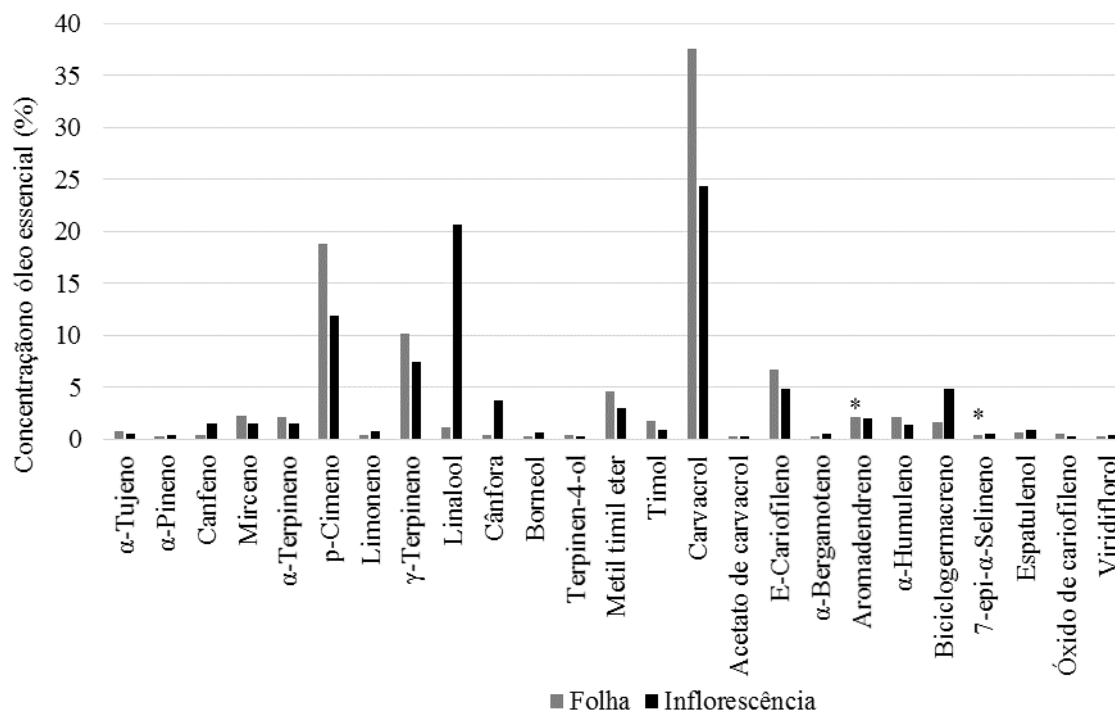


Figura 2.7- Concentração média dos componentes dos óleos essenciais de folhas e inflorescências de *L. origanoides*. \*Médias não diferem entre os órgãos segundo o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

O carvacrol, composto majoritário dos óleos essenciais de *L. origanoides*, é um monoterpeno fenólico bastante estudado por suas propriedades biológicas e terapêuticas (VELDHUIZEN, et al., 2006; HYLDGAARD et al., 2012). Assim como o timol, seu isômero, e o *p*-cimeno, precursor de ambos, o carvacrol é um dos poucos compostos que possuem anel aromático de origem isoprênica (Figura 2.6) (DEWICK, 2002). A presença de um grupo hidroxila ligado ao anel aromático confere ao carvacrol e ao timol elevada e ampla atividade antimicrobiana (VELDHUIZEN, et al., 2006; HYLDGAARD et al., 2012).

O *p*-cimeno, segundo composto mais abundante no OE das folhas e terceiro no das inflorescências, não possui o grupamento hidroxila e também não apresentou atividade contra bactérias quando testado isoladamente. Na presença de seus derivados oxigenados, este composto age sinergicamente potencializando a atividade antimicrobiana da mistura (HYLDGAARD et al., 2012). O linalool (Figura 2.7), segundo mais abundante no OE das inflorescências (Figura 2.6), é um álcool monoterpênico acíclico que também apresentou atividade antimicrobiana, menos eficiente e apenas contra bactérias gram-positivas (ASTOLFI et al., 2007; QUEIROGA et al., 2007).

A presença em grande quantidade de compostos com ação antimicrobiana no OE sugere que a finalidade ecofisiológica principal destes metabólitos em *L. origanoides* esteja relacionada à defesa contra micro-organismos fitopatogênicos. Sendo assim, o seu OE constitui

um mecanismo bioquímico de resistência pré-formado, também chamado de passivo ou constitutivo, pois está presente na planta anteriormente ao ataque do micro-organismo (STANGARLIN et al., 2011).

Como visto na tabela 2.3 e na figura 2.8, a concentração de biciclogermacreno apresentou aumento com o uso dos elicitores, sendo significativo apenas para FO. A propriedade antimicrobiana deste sesquiterpeno (Figura 2.6) ainda é desconhecida, apesar de estudos sugerirem uma possível ação antifúngica (SILVA et al., 2007; FONTENELLE et al., 2008).

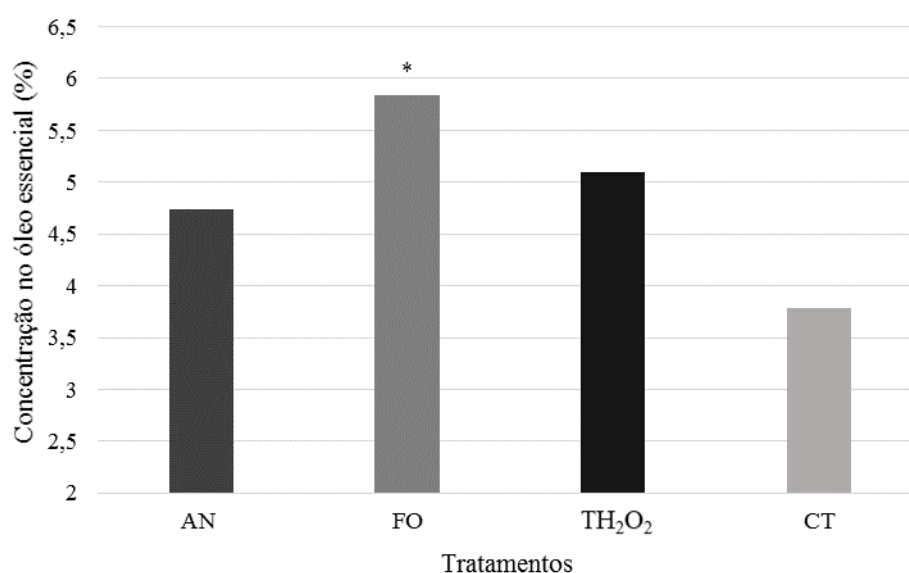


Figura 2.8- Concentração relativa (%) de biciclogermacreno no óleo essencial das inflorescências de plantas de *L. origanoides* pulverizadas com material celular de *Aspergillus niger* (AN) e *Fusarium oxysporum* (FO), solução de peróxido de hidrogênio (SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e água destilada (CT). \*Média difere do CT segundo o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Outros trabalhos também observaram alteração do conteúdo de componentes do óleo essencial em resposta à elicitação. Culturas de células de *Achillea millefolium* apresentaram elevado aumento na proporção de *p*-cimeno e redução do conteúdo de germacreno-D quando elicidadas com extrato de levedura ou com celulase (FIGUEIREDO et al., 1995). Material regurgitado de lagarta promoveu grande produção de oito compostos voláteis em mudas de milho, entre eles o linalool e o  $\alpha$ -*trans*-bergamoteno (TURLINGS et al., 1993).

A coevolução entre plantas e micro-organismos fitopatógenos permitiu a seleção de mecanismos de defesa vegetal que detectam certas moléculas constitutivas dos invasores e os combatem através de várias reações metabólicas, impedindo ou restringindo o progresso da infecção (CHISHOLM et al., 2006). Nesses casos, as células hospedeiras apresentam proteínas receptoras, chamadas proteínas R, que possuem sítio de ligação específico para uma

determinada molécula invasora de uma espécie ou gênero de fitopatógenos. Ao ocorrer esta ligação, a proteína R sinaliza a ativação de canais de fluxo iônico e de NADPH-oxidases, ligadas à membrana plasmática vegetal, e peroxidases da parede celular, que reduzem moléculas de oxigênio a radicais superóxido ( $O_2^-$ ). Por ser altamente reativo e tóxico para a célula, o  $O_2^-$  é rapidamente convertido a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela enzima superóxido dismutase (MEHDY, 1994).

O  $H_2O_2$  é uma das ERO's formadas normalmente nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomas, como subprodutos da fotossíntese e da respiração, sendo prontamente neutralizados por mecanismos antioxidantes nestes locais. Porém, quando a planta se encontra sob estresse esses ERO's têm sua concentração aumentada como parte do processo de resistência da planta (RESENDE et al., 2007). Em concentrações maiores, o  $H_2O_2$  participa da ativação da síntese de diversas enzimas, entre elas, as envolvidas na produção de ácido jasmônico, hormônio sinalizador da biossíntese de fitoalexinas, como os terpenos. O aumento da concentração de biciclogermacreno com o FO sugere a ativação desta cascata de sinalização nas células das inflorescências por este agente.

### 2.3.3 Teste de sensibilidade microbiana por microdiluição em caldo

Na tabela 2.4 estão dispostas as médias aritméticas de CIM, CBM e CFM referentes à variação entre as três repetições. O Tween 80, utilizado para misturar as amostras à água, não apresentou ação antimicrobiana nas concentrações testadas. Ambos os óleos essenciais de folhas e inflorescências apresentaram atividade antimicrobiana contra todos os micro-organismos testados, sendo o OE das folhas um pouco mais eficiente que o das inflorescências. Ambos foram mais efetivos contra *S. aureus* e *C. albicans* (Tabela 2.4).

O OE do tratamento CT das folhas apresentou, em geral, maior atividade antimicrobiana contra todos os micro-organismos comparado ao das inflorescências (Tabela 2.4). Este resultado pode ser devido principalmente à concentração relativa de carvacrol de 37,02% no OE das folhas (Tabela 2.2), enquanto nas inflorescências este monoterpene correspondeu a 24,82% (Tabela 2.3), ambos do CT. O carvacrol tem demonstrado atividade antimicrobiana promissora contra *S. aureus* (NOSTRO et al., 2007), *C. albicans* (CHAMI et al., 2004) e *E. coli* (BURT et al., 2007).

Apesar de não ter sido detectada diferença estatística na concentração dos componentes dos óleos essenciais das folhas entre os tratamentos, a pequena variação foi suficiente para determinar alteração da eficiência da atividade antimicrobiana. Frente a *E. coli*, o elicitor FO

reduziu a capacidade de inibição dos óleos essenciais tanto de folhas quanto de inflorescências, e todos os elicitores reduziram a atividade bactericida, principalmente do OE das folhas. Por outro lado, a atividade do OE de folhas e inflorescências contra *S. aureus* foi aumentada com o uso dos elicitores testados, principalmente FO que reduziu CBM de ambos os óleos e a CIM do óleo das inflorescências. Frente a *C. albicans* houve redução da CBM dos óleos essenciais de folhas elicitadas com todos os elicitores e dos óleos essenciais de inflorescências tratadas com FO e AN (Tabela 2.4).

Tabela 2.4- Médias das concentrações inibitória mínima (CIM), bactericida mínima (CBM) e fungicida mínima (CFM) dos óleos essenciais de *L. origanoides* ( $\mu\text{L/mL}$ ) sob elicitação, frente a diferentes micro-organismos.

Tratamento	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Candida albicans</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CFM
	Folhas					
AN	1,19	2,38	0,30	0,99	0,25	0,59
FO	2,38	3,17	0,30	0,99	0,30	0,59
SH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,58	3,96	0,30	0,79	0,30	0,59
CT	1,19	1,98	0,30	1,19	0,20	1,19
	Inflorescências					
AN	1,98	3,17	0,49	1,58	0,30	1,19
FO	2,38	3,17	0,40	0,79	0,30**	1,19**
SH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,98	2,38	0,40	0,99	0,30	2,38
CT	1,98	2,38	1,19	1,98	0,20	2,38
Cloranfenicol ( $\mu\text{g/mL}$ )	300	>300	6,25	>300		
Nistatina ( $\mu\text{g/mL}$ )					1,56	5,21

\*\*Valor correspondente a uma repetição. AN: *Aspergillus niger*; FO: *Fusarium oxysporum*; SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; CT: controle (água destilada).

A ausência de variações estatísticas no conteúdo dos componentes do OE das folhas observada entre os tratamentos não torna possível pontuar qual ou quais foram determinantes para as diferenças observadas na ação antimicrobiana. Todavia, pode-se sugerir alguns possíveis interferentes com base em informações existentes sobre a ação antimicrobiana de alguns componentes. O carvacrol, terpenoide com ampla e elevada atividade antimicrobiana, apresentou média de concentração com tendência a redução no OE das folhas do tratamento SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a aumento no AN em relação ao CT. A tendência ao aumento do *p*-cimeno no OE de folhas tratadas com FO e SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pode ter afetado a atividade, assim como e a redução do conteúdo de biciclogermacreno no OE de todos os tratamentos elicitores.

No OE das inflorescências, além do aumento estatisticamente significativo da proporção de biciclogermacreno com a aplicação dos elicitores, também pode ser observado uma tendência de elevação do conteúdo de linalool com o uso destes tratamentos. Estes dados coincidem com a elevação da CBM contra *E. coli* e com a redução da CIM contra *S. aureus*.

Houve ainda tendência a redução da porcentagem de carvacrol com o uso de FO.

Comparando os resultados de outros trabalhos com a espécie, percebe-se que cada composto contribui diferentemente a depender da sua concentração e do micro-organismo testado. O óleo essencial de *L. sidoides* rico em timol (85%) e pobre em carvacrol (0,4%) apresentou elevada atividade por contato gasoso contra *S. aureus*, bactéria gram-positiva, com CIM de 0,125 mg/L, entretanto não apresentou atividade frente a *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria gram-negativa (VERAS et al., 2012). Por outro lado, no teste de microdiluição em caldo, o óleo essencial de *L. origanoides* rico em carvacrol (47%) e em timol (13%) apesar de também não ter ação contra *P. aeruginosa*, mostrou elevada atividade contra bactérias gram-positivas, *Bacillus cereus* (CIM 0,62 µL/mL e CBM >20 µL/mL) e *Bacillus subtilis* (CIM e CBM 1,25 µL/mL) e também contra *Salmonella typhimurium* (CIM 1,25 µL/mL e CBM 10 µL/mL), bactéria gram-negativa (SARRAZIN et al., 2015). Arana-Sánchez et al. (2010) observaram que o OE contendo maior porcentagem de *p*-cimeno e menor de carvacrol e timol (42; 1 e 23%, resp.) apresentou maior atividade microbicida, em teste de diluição em caldo; tanto para *E. coli*, quanto para *P. aeruginosa* e *S. aureus* que aqueles com conteúdo maior de carvacrol (32; 2 e 38%, resp.) ou de timol (35; 19 e 7%, resp.).

Trabalhos que investigam as consequências da elicitação sobre a atividade biológica de OE são escassos. Grande parte dos estudos sobre elicitação, principalmente em plantas intactas, avaliam o aumento da resistência à pragas e doenças, sem investigar quais mecanismos metabólicos são ativados, nem como é seu modo de ação (GORELICK & BERNSTEIN, 2014). Turlings et al. (1993) observaram que a elicitação de mudas de milho com material regurgitado de lagartas herbívoras, além de aumentar a produção de terpenos voláteis, aumentaram a atração de duas espécies de vespas que parasitam estas larvas.

Os resultados observados para atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. origanoides* são promissores, considerando os frequentes casos de resistência microbiana das últimas décadas. As elevadas taxas de resistência decorrem em parte do aumento do consumo de medicamentos antimicrobianos no mundo associado ao seu uso de forma inadequada, como, por exemplo, em dose abaixo da ideal ou por tempo insuficiente. O resultado é a morte de cepas suscetíveis e a seleção daquelas com mecanismos de proteção contra a droga utilizada. Como consequência da redução da competição, ocorre a proliferação da cepa resistente e a ineficiência do medicamento utilizado, necessitando de desenvolvimento de drogas com outros mecanismos de ação e mais potentes. Medicamentos compostos por combinações de drogas com diferentes mecanismos de ação são produzidos como forma de evitar este processo, sendo geralmente são formados de duas ou três substâncias (ZIMERMAN, 2010).

Os óleos essenciais com atividade antimicrobiana apresentam uma vantagem natural nesse sentido. O OE geralmente é uma mistura complexa de compostos, as vezes possuindo mesmo tipo de atividade biológica com diferentes mecanismos de ação, ou seja, pode haver compostos que, por exemplo, atuam aumentando a permeabilidade da membrana plasmática de micro-organismos e outros que suprimem a produção de suas proteínas. Esta mistura torna as propriedades biológicas dos óleos essenciais, muitas vezes, fruto da soma ou da sinergia entre seus constituintes (LANGENHEIM, 1994), o que dificultaria a seleção de micro-organismos resistentes.

Os óleos essenciais de *L. origanoides* apresentam diversos compostos com atividade antimicrobiana em concentrações relativas variáveis, que podem ser padronizados através de técnicas agrícolas visando maior eficiência, como sugerem os resultados alcançados.

Estes resultados, assim como visto por Turlings et al. (1993), indicam que as alterações na composição do OE em resposta à elicitação são complexas, podendo envolver vários componentes, que, em conjunto, atuam protegendo a planta do agente agressor.



## 2.4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, infere-se que, no geral, a pulverização com suspensão de material celular de *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum* e com solução de peróxido de hidrogênio influencia a produção e ação biológica de terpenoides voláteis em folhas e inflorescências de plantas cultivadas de *L. origanoides*.

Em particular, a aplicação de peróxido de hidrogênio aumenta a produção de óleo essencial nas suas inflorescências. Componentes celulares elicitores de *F. oxysporum* promovem o aumento do conteúdo de biciclogermacreno no óleo essencial das inflorescências destas plantas. Os óleos essenciais de folhas e de inflorescências da espécie apresentam atividade contra cepas resistentes de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, com destaque para os dois últimos. A atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* destes óleos essenciais pode ser potencializada com a aplicação dos elicitores estudados, ao contrário do observado com *Escherichia coli*.

Desta forma, os elicitores avaliados mostram-se como possíveis ferramentas para potencializar a produção de terpenos voláteis com elevada atividade antimicrobiana no cultivo comercial de *L. origanoides*, com destaque para o peróxido de hidrogênio e material celular de *F. oxysporum*. Entretanto, são necessários estudos adicionais para analisar o efeito de diferentes concentrações de cada um destes elicitores, assim como a possibilidade de combinações entre eles, sobre a produção e atividade biológica destes metabólitos.

Por integrar resultados agrônômicos, fitoquímicos e biológicos, este trabalho traz contribuição para a área de cultivo e prospecção de plantas medicinais, dando suporte ao desenvolvimento de técnicas de cultivo adequadas que permitam a produção de matéria prima de qualidade.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Illinois, USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 804 p, 2007.
- ARANA-SÁNCHEZ, A. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* HBK) with different composition when microencapsulated in  $\beta$ -cyclodextrin. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 585-590, 2010.
- ASTOLFI, V. et al. Determinação de atividades biológicas do óleo essencial do Ho-Sho (*Cinnamomum camphora* Nees & Eberm). In: VIII CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL. **Anais eletrônicos...** Caxambu: Sociedade de Ecologia do Brasil. 2007. Disponível em: [www.seb-ecologia.org.br/viiiiceb/pdf/1269.pdf](http://www.seb-ecologia.org.br/viiiiceb/pdf/1269.pdf). Acesso em: 08 fev. 2017.
- BETANCUR-GALVIS et al. Antifungal, cytotoxic and chemical analyses of essential oils of *Lippia origanoides* HBK grown in Colombia. **Revista de la Universidad Industrial de Santander**. Bucaramanga v. 43, n. 2, p. 141-148, mai.-ago. 2011.
- BURT, S. A. et al. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157: H7. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 14, p. 4484-4490, 2007.
- CAMURÇA-VASCONCELOS et al. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v. 148, n. 3, p. 288-294, 2007.
- CASTRO, T. L. et al. Mecanismos de resistência da *Candida* Sp. Wwa antifúngicos. **Infarma**, Brasília, v. 18, n. 9, p. 10, 2006.
- CHAGAS, A. C. de S. et al. Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 7, n. 3, p. 427-432, 2016.
- CHAMI, F. et al. Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 909-914, 2004.
- CHISHOLM, S. T. et al. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 803-814, 2006.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution in antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M07-A9**, 9 ed., n. 2. Pensilvânia: CLSI, 2012a. 68p
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Informational Supplement. Approved Standard M27-S4**, 4 ed., Pensilvânia: CLSI, 2012b. 32p
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**, John Wiley & Sons: New York, 2002. 539p.
- ESCOBAR, P. et al. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp. essential oils and their major components. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 2, p. 184-190, mar. 2010.
- FIGUEIREDO, A. C. et al. Composition of the essential oil from cell suspension cultures of *Achillea millefolium* ssp. millefolium. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 40, n. 2, p. 113-118, 1995.
- FONTENELLE, R. O. S. et al. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. **Journal of applied microbiology**, v. 104, n. 5, p. 1383-1390, 2008.
- GORELICK, J.; BERNSTEIN, N. Elicitation: an underutilized tool for the development of medicinal plants as a source for therapeutic secondary metabolites. In: SPARKS, D. L. **Advances in Agronomy**. Londres: Academic Press, v. 124, 2014. p. 201-230.
- HELDT, H. W. **Plant biochemistry**. New York: Elsevier, 2005. 657 p.
- HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in microbiology**, v. 3, jan. 2012.
- LANGENHEIM, J. H. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. **Journal of chemical ecology**, v. 20, n. 6, p. 1223-1280, jun. 1994.

- LEÓN, J.; LAWTON, M. A.; RASKIN, I. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology**, v. 108, n. 4, p. 1673-1678, ago. 1995.
- MEHDY, M. C. Active oxygen species in plant defense against pathogens. **Plant physiology**, Washington, v. 105, n. 2, p. 467, 1994.
- MELO, M. T. P. et al. Produção de fitomassa e teor de óleo essencial de folhas de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) em diferentes espaçamentos de plantio. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 234-234, 2011.
- MENEZES, R. S. C. et al. Biogeochemical cycling in terrestrial ecosystems of the Caatinga Biome. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 72, n. 3, p. 643-653, ago. 2012.
- MORAIS, L. A. S. de Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, ago. 2009.
- MUELLER, M. J. et al. Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 16, p. 7490-7494, 1993.
- NAMDEO, A. G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. **Pharmacognosy reviews**, v. 1, n. 1, p. 69, jan.-mai. 2007.
- NOSTRO, A. et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of medical microbiology**, v. 56, n. 4, p. 519-523, 2007.
- PINTO, C. da P. et al. Antimicrobial activity of *Lippia* species from the Brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-5. 2013.
- QUEIROGA, C. L. et al. Linalool production from the leaves of *Bursera aloexylon* and its antimicrobial activity. **Fitoterapia**, Campinas, v. 78, n. 4, p. 327-328, 2007.
- RESENDE, M. L. V. et al. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo**, v. 15, p. 173-242, 2007.
- RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003.
- ROJAS, J et al. Comparative study of the chemical composition of the essential oil of *Lippia oreganoides* collected in two different seasons in Venezuela. **Natural Product Communications**, v. 1, n. 3, p. 205-207. 2006.
- SANTANA, M. R. S. et al. Perfil químico do óleo essencial de *Lippia oreganoides* Kunt coletado em três regiões do Estado de Roraima. In: 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. **Anais eletrônicos... Águas de Lindoia: Sociedade Brasileira de Química. 2015.** Disponível em: <http://www.s bq.org.br/38ra/cdrom/resumos/T1220-1.pdf>>. Acesso em: 09/08/2017.
- SARRAZIN, S. L. F. et al. Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia oreganoides* Kunth. **Lipids in health and disease**, Londres, v. 14, n. 1, p. 1-8, nov. 2015.
- SILVA, G. C. **Biorreguladores vegetais, substratos e estaquia em *Lippia oreganoides* Kunth (Verbenaceae)**. 2012. 1v. 82f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – UEFS, Feira de Santana, Bahia.
- SILVA, L. D. et al. Bicyclogermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). **Revista Brasileira Farmacognosia**, Curitiba, v. 17, p. 361-367, jul.-set. 2007.
- SILVA, M. M. et al. Variação de timol e carvacrol em *Lippia microphylla* Cham. ao longo do dia. In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **Anais eletrônicos...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Química. 2009. Disponível em: <[sec.s bq.org.br/cdrom/32ra/resumos/T1075-1.pdf](http://sec.s bq.org.br/cdrom/32ra/resumos/T1075-1.pdf)>. Acesso em: 09 nov. 2009.
- SMITH, R.; COAST, J. The true cost of antimicrobial resistance. **British Medical Journal** (Online), Londres, v. 346, p. 1-5, mar. 2013.
- SOUZA, M. F. de et al. Influência do sombreamento na produção de fitomassa e óleo essencial em alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 108-110, abr.-set. 2007.
- STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v. 10, n. 1, p. 18, 2011.

- STASHENKO, E. E. et al. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **Journal of separation science**, v. 33, n. 1, p. 93-103, out. 2010.
- TELES, S. et al. Organic and mineral fertilization influence on biomass and essential oil production, composition and antioxidant activity of *Lippia origanoides* HBK. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 169-176, ago. 2014.
- TOZIN, L. R. S.; MARQUES, M. O. M.; RODRIGUES, T. M. Glandular trichome density and essential oil composition in leaves and inflorescences of *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) in the Brazilian Cerrado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro v. 87, n. 2, p. 943-953, abr.-jun. 2015.
- TURLINGS, T. C. J. et al. An elicitor in caterpillar oral secretions that induces corn seedlings to emit chemical signals attractive to parasitic wasps. **Journal of Chemical Ecology**, Bethesda MD, v. 19, n. 3, p. 411-425, 1993.
- VELDHUIZEN, E. J. A. et al. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1874-1879, mar. 2006.
- VERAS, H. N. H. et al. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. **Fitoterapia**, v. 83, n. 3, p. 508-512, 2012.
- ZAMBRANO, E. L. et al. Efecto de la fertilización nitrogenada en el rendimiento y la composición de los aceites esenciales de especies y accesiones de *Lippia*. **Acta Agronómica**, Palmira, v. 62, n. 2, p. 129, abr.-jun. 2013.
- ZARDO, V.; MEZZARI, A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida* sp. **NewsLab**, São Paulo, v. 63, p. 136-146, 2004.
- ZHAO, J.; DAVIS, L.C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 4, p. 283-333, jun. 2005.
- ZIMERMAN, R. A. Uso indiscriminado de antimicrobianos e resistência microbiana. **Uso racional de medicamentos: Temas selecionados**. Ministério da saúde, n. 3, 2010.

### **CAPÍTULO 3**

#### **ELICITAÇÃO DE PLANTAS DE *Lippia origanoides* KUNTH CULTIVADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO**

### 3 CAPÍTULO: ELICITAÇÃO DE PLANTAS DE *Lippia origanoides* KUNTH CULTIVADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO

#### RESUMO

*Lippia origanoides* é uma planta medicinal nativa com elevado potencial na produção de fitoterápicos, no entanto, sem protocolo de cultivo que padronize e potencialize a produção de princípios ativos. A elicitação é um método que visa estimular a produção de metabólitos secundárias das plantas. Assim, este trabalho objetivou avaliar a influência de elicitores na composição, atividades antioxidante e fotoprotetora da espécie. Extratos metanólicos de folha, inflorescência, caule e raiz de plantas pulverizadas com suspensões de material celular dos fungos *Aspergillus niger* (AN) e *Fusarium oxysporum* (FO), solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,5 M (SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e água destilada (CT) tiveram seus teores de compostos fenólicos (TCFT), equivalentes a ácido gálico, e flavonoides totais (TFT), equivalentes a quercetina, atividade de Sequestro de Radical Livre DPPH• (SRL), Fator de Proteção Solar (FPS) e razão UVA/UVB analisados por espectrofotometria. O extrato com os melhores resultados foi incorporado em formulações fotoprotetoras (FFP) cuja ação foi avaliada. FO e SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduziram o TCFT dos extratos do caule e da raiz e FO reduziu o TFT da raiz. FO aumentou atividade de SRL dos extratos do caule e AN e SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduziram a da raiz. SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e AN aumentaram o FPS dos extratos do caule e SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o da inflorescência, que teve o maior valor (8,1). FO aumentou a razão UVA/UVB de folha e SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduziu a do caule. O extrato de inflorescência (elicitado por SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 10% aumentou o FPS de formulações com metoxicinamato de octila 7% e com este mais benzofenona a 3,5%, além de aumentar a razão UVA/UVB em todas as formulações. Assim, conclui-se que a elicitação é uma técnica promissora em aumentar a atividade fotoprotetora de *L. origanoides*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Estimulação metabólica. Fungos fitopatogênicos. Peróxido de hidrogênio. Compostos antioxidantes. Atividade fotoprotetora. Formulações fotoprotetoras.

#### ABSTRACT

*Lippia origanoides* is a native medicinal plant with high potential for phytotherapeutic production, but it has not a culture protocol that standardizes and potentiates the production of active principles. Elicitation is a method that aims to stimulate the production of plants secondary metabolites. Thus, this work aimed to evaluate the influence of elicitors on the composition, antioxidant and photoprotective activities of the species. Methanolic extracts from leaf, inflorescence, stem and root of plants sprayed with *Aspergillus niger* (AN) and *Fusarium oxysporum* (FO) cellular material suspensions, 0.5 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution (SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and distilled water (CT) had total flavonoids (TF) as quercetin equivalents, total phenolic compounds (TPC) as gallic acid equivalents, DPPH• free radical scavenging activity (FRS), Solar Protection Factor (SPF) and UVA/UVB ratio analyzed by spectrophotometry. The most promising extract was incorporated in photoprotective formulations (PPF) whose action was evaluated. FO and SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduced TPC from stem and root extracts, and FO reduced root TF. FO increased the FRS activity of stem extract. AN and SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduced the FRS activity of root. SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and AN increased the SPF of the stem extracts and SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> raised it of the inflorescence extracts, which had the highest value (8.1). FO increased the UVA/UVB ratio of leaf and SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduced it of

the stem. The inflorescence extract (elicited by SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) at 10% increased the SPF of formulations with 7% octyl methoxycinnamate and with this one plus 3.5% benzophenone, in addition it increased the UVA/UVB ratio in all formulations. Thus, it is concluded that elicitation is a promising technique to increase the photoprotective activity of *L. organoides*.

**KEY WORDS:** Metabolic stimulation. Phytopathogenic fungi. Hydrogen peroxide. Antioxidant compounds. Photoprotective activity. Photoprotective formulations.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o Brasil tem apresentado aumento no déficit comercial na cadeia produtiva de plantas medicinais, apesar de as exportações terem crescido mais que as importações (RODRIGUES, 2016). Grande parte da droga vegetal produzida no país apresenta baixa qualidade, atribuída à carência dos produtores de conhecimentos técnicos e à escassez de recursos necessários ao cultivo de plantas medicinais com qualidade (CASTRO & ALBIERO, 2016). Além disso, o reduzido volume de pesquisas validando e padronizando o uso de espécies nativas faz com que a maioria dos fitoterápicos registrados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) seja baseada em espécies exóticas e importadas, amplamente estudadas (RODRIGUES, 2016).

Dentre os milhares de espécies medicinais pouco exploradas pertencentes à flora brasileira, *Lippia organoides* Kunth. é um arbusto aromático com reconhecidas atividades antimicrobiana e escabicida, entre outras potenciais propriedades terapêuticas (PASCUAL et al., 2001). Sob o seu sinônimo mais conhecido, *Lippia sidoides* Cham., esta planta faz parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS e apresenta formulações de infusão, tintura, gel e sabonete líquido descritas no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, para uso como anti-inflamatório e antisséptico bucais e/ou antisséptico, antimicótico e escabicida nas afecções da pele e couro cabeludo (BRASIL 2009; 2011). Apesar do elevado potencial biológico, não se tem registro de medicamento fitoterápico com base nesta espécie. Uma das causas é a ausência de sistema de cultivo estabelecido que permita a produção em larga escala, garantindo a produtividade de matéria prima com qualidade e segurança exigidos (CASTRO & ALBIERO, 2016).

Dentre os parâmetros para certificar um insumo vegetal como adequado ao uso na indústria fitofarmacêutica, está a qualidade fitoquímica. Este critério baseia-se na presença dos princípios ativos em quantidade suficiente para a preservação da ação terapêutica para a qual o medicamento fitoterápico é proposto. Plantas medicinais produzem fitocomplexo, contendo

muitas vezes diversas substâncias agindo sinergicamente, tornando a padronização da qualidade da droga vegetal e seus extratos mais difícil (KLEIN et al., 2009).

Esta variedade de substâncias com atividades terapêuticas é produto do metabolismo secundário das plantas, produzida com a função adaptativa. Através destes metabólitos, o vegetal responde a flutuações nas condições físico-químicas ambientais e interage com outras plantas e com polinizadores, dispersores de sementes, micro-organismos patogênicos e simbiontes, herbívoros, etc. Logo, o teor de princípios ativos de plantas medicinais varia a depender do local e das condições de seu crescimento (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). Por esse motivo, estudos agrônômicos que estabeleçam a otimização da produtividade de biomassa e dos compostos ativos são parte fundamental das etapas da produção de fitomedicamentos (KLEIN et al., 2009).

A elicitação surgiu neste contexto como um recurso agrônômico visando alcançar este objetivo. A técnica consiste no estímulo à biossíntese de compostos de interesse através da exposição dos vegetais a agentes capazes de ativar o seu metabolismo de defesa. Os elicitores podem ser biomoléculas oriundas de fitopatógenos ou herbívoros, fito-hormônios, moléculas inorgânicas ou estressores físicos (GORELICK & BERNSTEIN, 2014). Assim, são necessárias pesquisas voltadas para a identificação de elicitores que provoquem a mobilização do aparato enzimático e das reservas energéticas da planta sob cultivo para a produção de princípios ativos, que resultem em aumento da eficiência da ação terapêutica do vegetal.

Considerando a carência de estudos relacionando desde as condições de cultivo e ecofisiológicas com as propriedades fitoquímicas em paralelo às ações biológicas de plantas medicinais, em particular para a espécie referida, e diante do exposto, este estudo visou avaliar a influência de aplicações foliares de elicitores na composição, atividades antioxidante e fotoprotetora de extratos metanólicos de *L. origanoides*.



## 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi executado segundo esquema apresentado na figura 3.1.

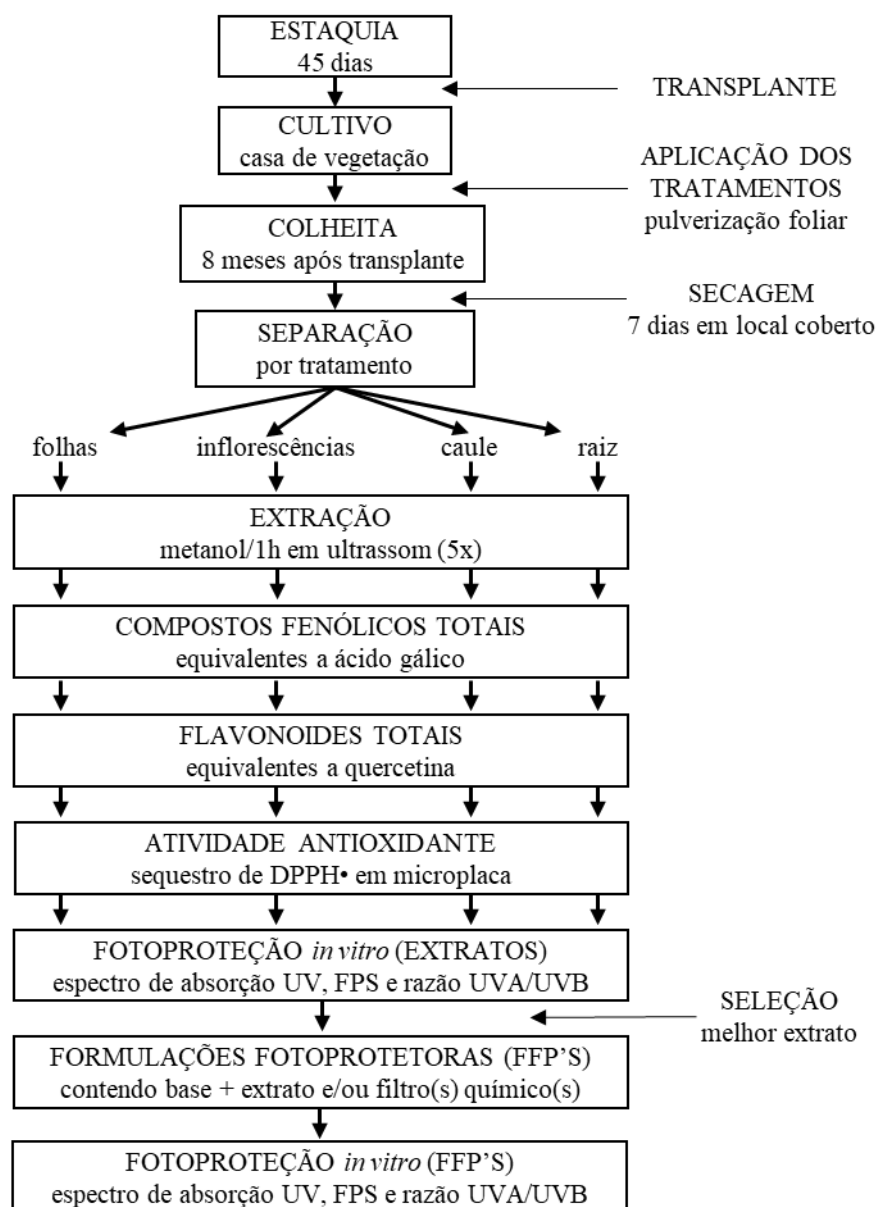


Figura 3.1- Esquema experimental.

### 3.2.1 Propagação e cultivo das plantas

As plantas foram propagadas e cultivadas na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Bahia. Os espécimes mantidos na Coleção de Plantas Aromáticas da Unidade foram utilizados como matrizes na produção de estacas apicais com cerca de 12 cm e 2 cm da base desfolhados (HUEFS 83.373). As estacas foram

mantidas com suas bases submersas em solução de ácido indolbutírico a 278 mg/mL por 24 horas para estimular o enraizamento. Posteriormente, elas foram cultivadas em mistura de Biomix® e vermiculita expandida fina, em placas de poliestireno expandido com 200 poços e mantidas em casa de vegetação com nebulização intermitente e irrigação diária (SILVA, 2012).

Após 45 dias, as mudas enraizadas foram transplantadas individualmente para tubos de PVC (60 cm de altura x 25 cm de diâmetro, 15 litros de capacidade) apoiados por pratos plásticos, contendo terra vegetal e esterco bovino (5:1) e superfosfato simples (18% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; 1 kg/m<sup>3</sup> da mistura). Os tubos foram organizados em casa de vegetação (75% de luminosidade) em grupos de quatro plantas com distância de 30 cm entre elas, dispostas em quadrado, e 1 m entre os grupos. As plantas permaneceram em crescimento irrigadas diariamente por oito meses, de junho de 2014 a fevereiro de 2015, tempo suficiente para o crescimento adequado à realização do experimento. Durante o último mês, foram aplicados os tratamentos.

### 3.2.2 Preparo e aplicação dos elicitores

Foram preparadas suspensões de material celular dos fungos *Aspergillus niger* (AN) e *Fusarium oxysporum* (FO), concedidos pelo Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Recôncavo Baiano. Sete placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Dfco™ Batata Dextrose Agar) a 39 g/L foram inoculadas com cada espécie e acondicionadas em estufa de crescimento a 28 °C por 72 horas. Após, as placas foram enviadas ao Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos (Lapron), onde foi feita a raspagem do material celular da superfície do meio de cultura com o auxílio de alça microbiológica e a adição de 10 mL de água destilada por placa. As suspensões de cada fungo foram reunidas (70 mL) em frascos de vidro e levadas à autoclave a 1 atm por 20 minutos a 121 °C, para esterilização, e depois ao banho de ultrassom por 30 minutos, para lise celular, sendo mantidas a 2 °C em geladeira.

As soluções elicitoras foram preparadas no dia do uso. Para tanto, foram retirados 17,5 mL de cada suspensão de fungo, após homogeneização, e avolumados para 1 L. Também foi preparada solução de peróxido de hidrogênio (SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 0,5 M (LEÓN et al., 1995). Plantas do tratamento controle foram pulverizadas com água destilada (CT). Cada tratamento apresentou quatro grupos (4 tratamentos x 4 grupos x 4 plantas). Foi realizado sorteio para a distribuição dos tratamentos entre os grupos. Os tratamentos foram aplicados pela manhã com pulverizador manual nas folhas, sendo 100 mL/grupo. Foram realizadas quatro aplicações durante o mês de fevereiro, com intervalos de sete dias.

### 3.2.3 Obtenção dos extratos metanólicos

Passados sete dias da última aplicação, as plantas foram colhidas pela manhã. Folhas, inflorescências, caule e raiz foram separados e dispostos em bandejas em local coberto arejado para secagem por sete dias. No Lapron, realizou-se a união das drogas vegetais dos quatro grupos de cada tratamento, reduzindo o número de amostras para 16 (4 tratamentos x 4 órgãos).

As drogas vegetais foram trituradas em moinho de facas, pesadas e colocadas em erlenmeyer de vidro de 5 L. Um volume de solvente conhecido foi adicionado para molhar a droga vegetal, antes de ser adicionado o volume para extração. A proporção de droga vegetal/metanol utilizada foi determinada para cada órgão levando-se em conta o volume necessário para ultrapassar a droga vegetal (Tabela 3.1). Foram realizados cinco ciclos de extração/droga vegetal, de uma hora em banho de ultrassom entre 27 e 30 °C, com posterior filtração do solvente em gaze e algodão e aplicação de novo solvente.

As soluções extrativas obtidas tiveram o excesso de solvente evaporado em evaporador rotativo a vácuo. Posteriormente, foram dispostas em frascos de vidro previamente identificados e tarados, que permaneceram em capela com exaustão até a completa evaporação do solvente. Os extratos de folha absorveram umidade do ambiente e por isso foram liofilizados a -45 °C e 0,07 mbar por 41 horas. Posteriormente, os extratos foram pesados e os seus rendimentos determinados em porcentagem de g de extrato/g de droga vegetal (Tabela 3.1). O teor de umidade da droga vegetal foi obtido através de secagem de 1 g de droga vegetal triturada por cinco horas em estufa de circulação de ar a 105 °C (Tabela 3.1).

Tabela 3.1- Proporção de solvente por massa de droga vegetal utilizada por ciclo de extração, média e desvio padrão do teor de umidade da droga vegetal e de rendimento de extrato metanólico por órgão de plantas de *L. origanoides*.

Órgão	Proporção de solvente (m/v)	% umidade da DV	Rendimento (%)
Folha	1:2	10,7±0,2	7,57±0,33
Inflorescência	1:6	11,6±0,3	5,05±0,50
Caule	1:2	11,1±0,7	2,49±0,44
Raiz	1:3	8,9±0,1	4,08±0,75

### 3.2.4 Teor de fenólicos totais dos extratos

O teor de fenólicos totais foi obtido segundo Peres et al. (2009). Para isso, foi pesado 0,01 g de extrato e dissolvido em 10 mL de metanol com auxílio de ultrassom, produzindo solução de amostra com concentração inicial de 1000 µg/mL, que foi diluída conforme a necessidade de ajuste de concentração do ensaio. Desta solução, adicionou-se 100 µL a 1000 µL de água ultrapura e 200 µL de reagente Folin Ciocalteu (Dinâmica) e homogeneizou-se.

Após cinco minutos, adicionou-se 600  $\mu\text{L}$  de carbonato de sódio a 15% e 3100  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e homogeneizou-se em Vortex<sup>®</sup>. Depois de repouso por 90 minutos protegido da luz, foi realizada leitura da absorbância em espectrofotômetro Shimadzu<sup>®</sup> 1800 a 750 nm.

A absorbância foi usada para calcular o teor de fenólicos totais a partir da equação linear da curva de calibração do ácido gálico (Figura 3.2), produzida com onze concentrações de 40 a 400  $\mu\text{g/mL}$ . Para cada amostra, o teste foi realizado em triplicata desde a pesagem, de cada uma fez-se três misturas reacionais (3 repetições x 3 leituras). O teor de fenólicos totais foi calculado em mg de Equivalente a Ácido Gálico (EAG)/g de extrato.

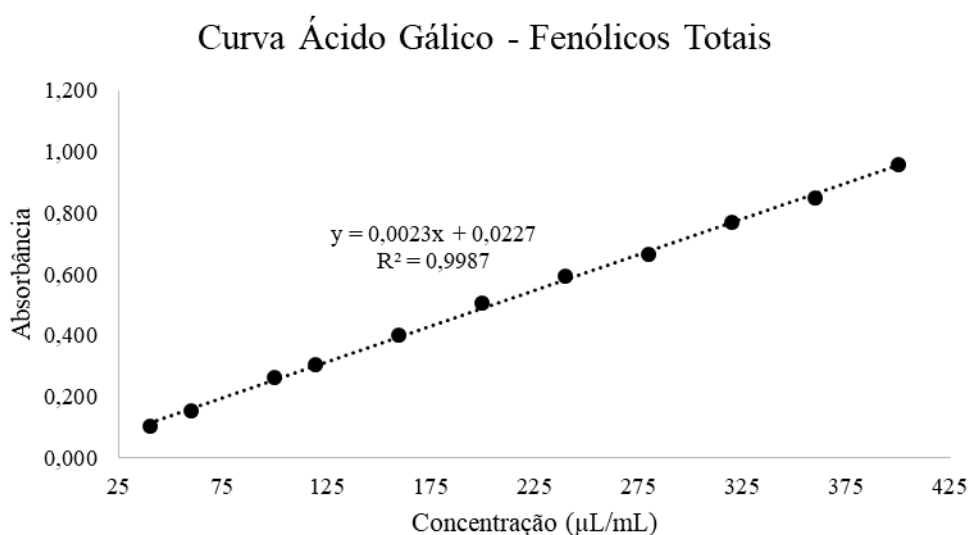


Figura 3.2- Curva de calibração do padrão utilizado na determinação do teor de compostos fenólicos totais Equivalentes a Ácido Gálico (EAG).

### 3.2.5 Teor de flavonoides totais dos extratos

O teor de flavonoides totais nos extratos foi determinado segundo Banov et al. (2006), com modificações. Para isso, as amostras foram preparadas segundo o tópico acima. Um volume de 1500  $\mu\text{L}$  de amostra foi adicionado a 100  $\mu\text{L}$  de solução metanólica de cloreto de alumínio a 5% e 3400  $\mu\text{L}$  de solução metanólica de ácido acético glacial a 5%, homogeneizou-se em Vortex<sup>®</sup> e reservou-se ao abrigo da luz. Após 30 minutos procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro Shimadzu<sup>®</sup> 1800 a 425 nm.

A equação linear da curva de calibração da quercetina, produzida com dez concentração de 5 a 50  $\mu\text{g/mL}$ , foi utilizada para o cálculo do teor de flavonoides totais (Figura 3.3). Para cada amostra, o teste foi realizado em triplicata desde a pesagem, de cada uma fez-se três

soluções reacionais (3 repetições x 3 leituras). O teor de flavonoides totais foi calculado em mg de Equivalente a Quercetina (EQ)/g de extrato.

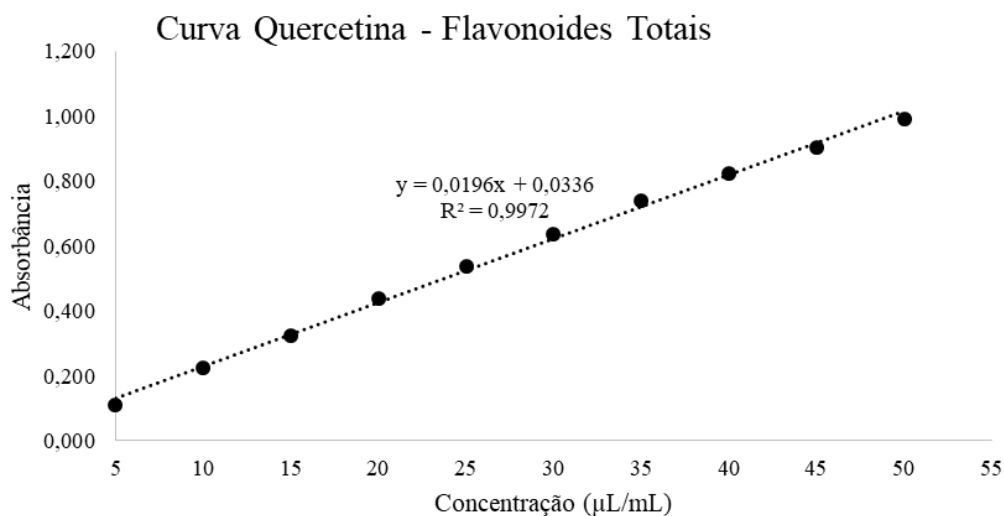


Figura 3.3- Curva de calibração do padrão utilizado na determinação do teor de flavonoides totais Equivalentes a Quercetina (EQ).

### 3.2.6 Atividade antioxidante dos extratos metanólicos

Para a avaliação da atividade antioxidante, foi mensurada a atividade sequestradora de radicais livres de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) das soluções extrativas. Este teste avalia a capacidade de uma substância de doar hidrogênio para a conversão do DPPH• (púrpura) em DPPH-H (amarelo), forma menos reativa (Figura 3.4).

A atividade antioxidante foi analisada pelo teste descrito por Sousa et al. (2007), adaptado para microplaca de 96 poços. A preparação das amostras foi feita diluindo-se 0,01 g de extrato em 10 mL de metanol no ultrassom, obtendo-se concentração inicial de 1000 µg/mL, a partir da qual diferentes diluições foram preparadas.

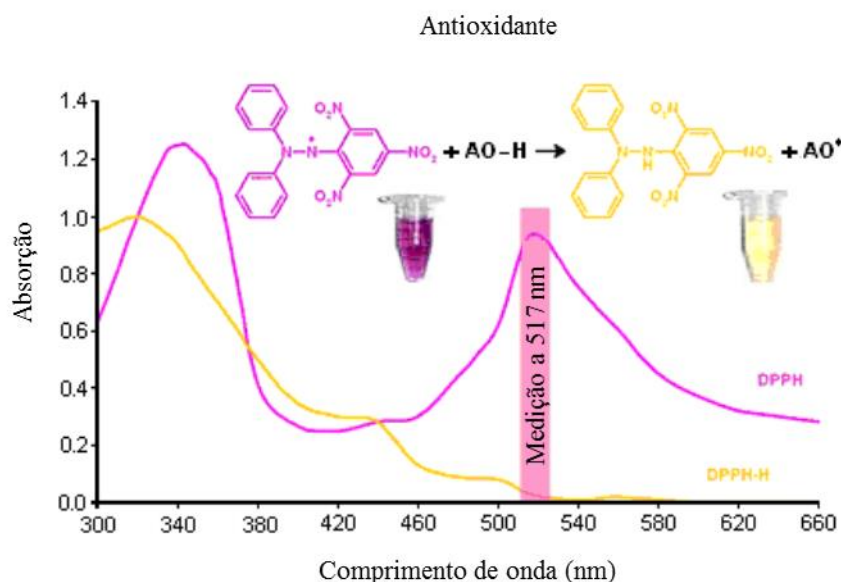


Figura 3.4- Espectros de absorção eletromagnética do DPPH• e do DPPH-H e a reação de redução por um agente antioxidante (AO-H). Imagem adaptada de Boligon et al. (2014).

Em cada poço foram acrescentados 60  $\mu\text{L}$  de amostra em diferentes concentrações e 120  $\mu\text{L}$  de solução metanólica de DPPH• a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ajustada para 1,0 de absorbância em espectrofotômetro Shimadzu® 1800 em 517 nm (Figura 3.5). Para cada concentração fez-se um controle da amostra adicionando-se metanol no lugar da solução de DPPH•. Quatro poços foram preenchidos com 180  $\mu\text{L}$  de metanol, para se descontar o valor do branco das absorbâncias. Em outros quatro poços, foram adicionados 60  $\mu\text{L}$  de metanol e 120  $\mu\text{L}$  de solução de DPPH•, para se obter a absorbância dessa solução. Após 30 minutos no escuro, a absorbância foi obtida a 492 nm em leitor de microplacas Biochrom® controlado pelo programa de computador Galapagos. Como o aparelho apresenta poucas opções de comprimento de onda, optou-se por utilizar o valor mais próximo de 517 nm, utilizado no teste original.

O decréscimo na densidade ótica foi avaliado comparando-se à absorção do controle da solução de DPPH•. Assim, estabeleceu-se a porcentagem de descoloração do radical DPPH•, isto é, a porcentagem de Sequestro de Radical Livre (SRL), calculada através da equação:

$$\% \text{SRL} = \frac{[\text{Abs}_{\text{DPPH}\cdot} - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{cont. amostra}})]}{\text{Abs}_{\text{DPPH}\cdot}} \times 100$$

Em que,  $\text{Abs}_{\text{DPPH}\cdot}$  é a absorbância do controle da solução de DPPH•,  $\text{Abs}_{\text{amostra}}$  é a absorbância da solução contendo DPPH• e a amostra, e  $\text{Abs}_{\text{cont. amostra}}$  é a absorbância do controle da amostra.

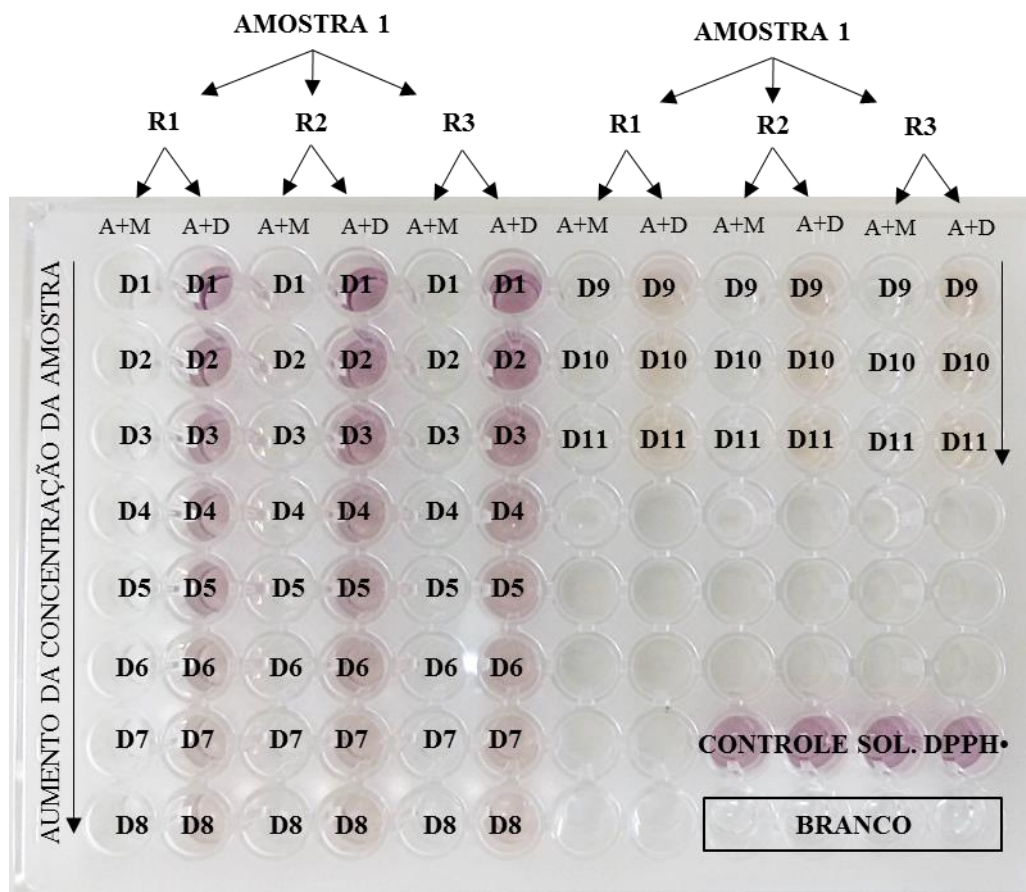


Figura 3.5- Distribuição das diferentes diluições da amostra (D1 a D11) de extrato metanólico, em microplaca de 96 poços no teste de sequestro de radical DPPH•. R1, R2 e R3: repetições; A+M: 60  $\mu$ L de amostra + 120  $\mu$ L de metanol; A+D: 60  $\mu$ L de amostra + 120  $\mu$ L de solução de DPPH•; Branco: 180  $\mu$ L de metanol.

Através dos resultados de %SRL de cada concentração foi criado gráfico relacionando a concentração à atividade. A %SRL de um antioxidante em função da sua concentração segue o modelo de curva S, em que há uma faixa de concentração cujo gráfico apresenta comportamento linear ascendente. As faixas de concentração foram ajustadas para se alcançar a reta da curva S (Figura 3.6 – linha verde). A partir da linha de tendência do gráfico foi gerada uma equação linear que permite o cálculo da Concentração das amostras Eficiente em reduzir em 50% ( $CE_{50}$ ) dos radicais de DPPH•. Os testes cujas equações apresentaram  $R^2$  abaixo de 0,99 foram refeitos.

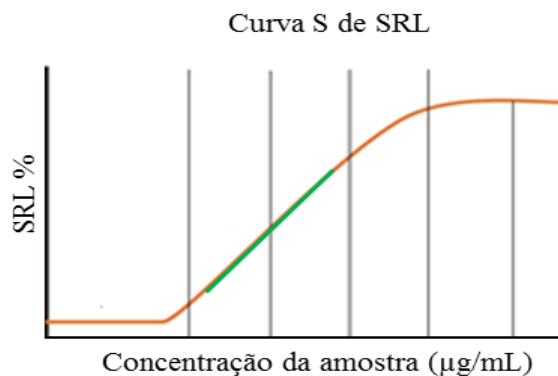


Figura 3.6- Modelo de curva de porcentagem de sequestro de radical livre (SRL) de DPPH• em função da concentração de amostra antioxidante.

### 3.2.7 Atividade fotoprotetora

#### 3.2.7.1 Espectro de absorvância UV dos extratos metanólicos

A atividade fotoprotetora dos extratos foi avaliada através da determinação do perfil de absorvância, identificação da faixa de comprimento de onda com absorvância máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ ), cálculo da Razão UVA/UVB (VELASCO et al., 2011) e posterior cálculo do fator de proteção solar *in vitro* dos extratos, segundo fórmula desenvolvida por Mansur et al. (1986).

Para isso, alíquotas das amostras foram secas em estufa de circulação de ar a 45 °C por uma hora, exceto os extratos de folha, porque foram liofilizados. Depois, pesou-se 0,01g da amostra seca e dissolveu-se em 10 mL de etanol absoluto, com o auxílio de banho de ultrassom. Após dissolução total do extrato, foram preparadas soluções com concentrações de 5, 25, 50 e 100 mg/L. As leituras de absorvância foram feitas em espectrofotômetro usando-se cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. As absorvâncias foram medidas entre os comprimentos de 260 a 400 nm, com intervalos de 5 nm, para verificar a máxima absorvância na região ultravioleta (UVA, UVB e UVC), segundo Oliveira Junior et al. (2013). Para o branco foi utilizado apenas etanol absoluto. Os testes foram realizados em triplicata desde a pesagem.

#### 3.2.7.2 Fator de Proteção Solar *in vitro* e razão UVA/UVB

Com os dados da absorvância na faixa entre 290 e 320 nm, foi calculado o Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro* das amostras através da equação desenvolvida por Mansur et al. (1986):



$$\text{FPS}_{\text{espectrométrico}} = \text{FC} \times \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda) \times \text{Abs}(\lambda)$$

Onde:

FC = fator de correção igual a 10;

EE ( $\lambda$ ) = efeito eritemogênico da radiação de comprimento de onda (nm);

I ( $\lambda$ ) = intensidade da radiação solar no comprimento de onda ( $\lambda$ ) nm;

Abs ( $\lambda$ ) = leitura espectrofotométrica da absorbância da solução do filtro solar/extrato no comprimento de onda  $\lambda$  (nm).

Na fórmula, EE ( $\lambda$ )  $\times$  I ( $\lambda$ ) representa constantes que foram determinadas em testes onde se comparou a atividade fotoprotetora analisada em espectrofotômetro com a atividade observada em testes *in vivo* com voluntários (SAYRE et al., 1979). Os valores das constantes para os comprimentos de onda UVB avaliados estão demonstrados no quadro 3.1.

Quadro 3.1- Valores das constantes EE ( $\lambda$ )  $\times$  I ( $\lambda$ ) previamente determinadas para o cálculo do FPS (SAYRE et al., 1979).

$\lambda$ (nm)	EE $\times$ I (constantes)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Total	1,0000

A Anvisa determina que a proteção contra a radiação UVA dos protetores solares comercializados no Brasil seja, pelo menos, 30% do fator de proteção solar indicado no rótulo para UVB (BRASIL, 2012). Neste sentido, o cálculo da Razão UVA/UVB determina a proporção entre a absorbância na faixa do UVA e na faixa do UVB. Para tanto, utiliza-se a equação abaixo:

$$\frac{\text{UVA}}{\text{UVB}} = \frac{\int_{320\text{ m}}^{400\text{ m}} A\lambda \cdot d\lambda}{\int_{290\text{ m}}^{320\text{ m}} A\lambda \cdot d\lambda}$$

Em que  $A_{\lambda}$  é a absorvância em um determinado comprimento de onda;  $d\lambda$  é o intervalo entre os comprimentos de onda, que é igual a 5. Esta fórmula consiste na divisão da somatória das áreas sob a curva de absorvância entre duas leituras sequenciais em toda a faixa do UVA, pela somatória das áreas na faixa do UVB (Figura 3.7). A partir do resultado obtido por esta equação, ao protetor solar são conferidas estrelas classificando a sua ação anti-UVA, segundo descrição do quadro 3.2 (VELASCO et al., 2011).

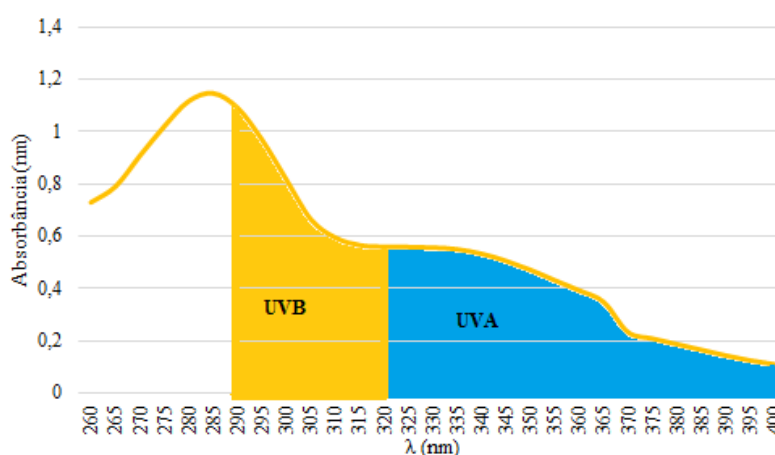


Figura 3.7- Áreas de absorção de um protetor solar na faixa de comprimento de onda ( $\lambda$ ) do UVB e do UVA calculadas para a determinação da Razão UVA/UVB.

Quadro 3.2- Sistema Boot's Star Rating relacionado com a razão UVA/UVB conforme Revised Guidelines to the Practical Measurement of UVA (2004) (Levy, 2007; Boots the Chemists, 2004).\*

Proteção Anti-UVA		
UVA/UVB	Estrelas	Descrição <sup>a</sup>
0,0 até < 0,2	-	Muito baixa
0,2 até < 0,4	*	Moderada
0,4 até < 0,6	**	Boa
0,6 até < 0,8	***	Superior
0,8 até < 0,9	****	Máxima
$\geq 0,9$	*****	Ultra

<sup>a</sup>Descrição da relação da razão UVA (proteção a esta radiação) com a quantidade de estrelas. \*Quadro, título e nota retirados de Velasco et. al. (2011).

### 3.2.7.3 Formulações fotoprotetoras (FFP's)

A partir da comparação entre as médias de FPS dos extratos, pôde-se determinar o órgão e o tratamento que produziram extrato com maior atividade fotoprotetora. Este extrato foi selecionado para o desenvolvimento de Formulações Fotoprotetoras (FFP) com o objetivo de

verificar seu potencial como adjuvante de compostos fotoprotetores utilizados em FFP's comerciais.

#### 3.2.7.4 Obtenção da base A/O

A base Lanette N foi utilizada para o preparo das FFP's. Ela constitui-se de uma emulsão produzida a partir da mistura de compostos hidrofílicos (fase Aquosa) e compostos lipofílicos (fase Oleosa) (A/O), cujas composições encontram-se listadas no quadro 3.3. A base pronta foi adquirida na Farmácia de Manipulação Essência Vitae, localizada no município de Feira de Santana.

Quadro 3.3- Composição da base A/O

Componente	Função	Quantidade (para 12 kg de base)
Fase aquosa		
EDTA	antioxidante	18 g
Propilenoglicol	umectante	240 g
Água destilada	veículo	9756 mL
Fase oleosa		
Lanette N	base aniônica	1440 g
Cetiol SN	emoliente	480 mL
Myritol 318	emoliente	240 mL
BHT	conservante	6 g
Nipagim	conservante	21,6 g
Nipazol	conservante	2,4 g

Segundo o procedimento de preparo da base, fornecido pela farmácia, mediu-se separadamente os componentes da Fase Aquosa (Fase A) e da Fase Oleosa (Fase O), adicionando-os em recipientes de aço inox. Os componentes da Fase A foram aquecidos a 80 °C e da Fase O, aquecidos a 70 °C. Verteu-se lentamente, com agitação vigorosa e constante, a Fase A sobre a Fase O, mantendo a temperatura constante por cinco a dez minutos. Reduziu-se a agitação até a temperatura alcançar 40 °C. A base formulada é uma emulsão aniônica branca de média viscosidade e pH entre 5,5 e 6,5.

Além da base A/O pura, foram adquiridas FFP contendo 14% de benzofenona e outra contendo 14% de metoxicinamato de octila, incorporados no mesmo tipo de base acima descrito (Figura 3.8).

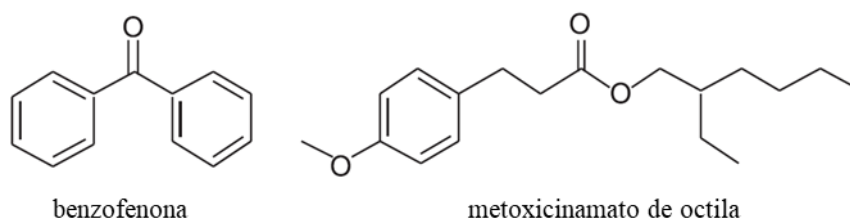


Figura 3.8- Compostos fotoprotetores comerciais utilizados (GUARANI et al., 2009).

### 3.2.7.5 Preparo das FFP's

Considerando a pouca quantidade do extrato selecionado, as formulações foram produzidas em quantidade reduzida. Foram preparadas sete FFP's de acordo com o quadro 3.4. Anteriormente, foram preparadas três misturas entre as FFP's e a base A/O adquiridas, para que o volume pesado no preparo das FFP's contendo extrato fosse maior e o erro fosse reduzido. As misturas foram feitas conforme descrição abaixo:

- a) 2,5 g de benzofenona a 14% (FFP) + base A/O q.s.p. 9 g;
- b) 5 g de octil metoxicinamato a 14% (FFP) + base A/O q.s.p. 9 g;
- c) 5 g de benzofenona a 14% (FFP) + 10 g de octil metoxicinamato a 14% (FFP) + base A/O q.s.p. 18 g.

Antes da pesagem, o extrato permaneceu por uma hora em estufa de circulação de ar a 45 °C. Em um cadinho de 5 mL tarado, pesou-se 0,01 g de extrato e depois completou-se com a base A/O, ou uma das misturas (a, b ou c), em quantidade suficiente para (q.s.p.) 0,1 g de formulação. Para as FFP's sem o extrato, pesou-se 0,01 g de base A/O e completou-se com uma das misturas (a, b ou c) em q.s.p. 0,1 g. Posteriormente, procedeu-se a incorporação dos componentes à formulação com o auxílio de um bastão de vidro até a completa homogeneização. Cada FFP foi preparada em triplicata desde a pesagem.

Quadro 3.4- Composição quali-quantitativa das formulações fotoprotetoras produzidas a partir do extrato de *L. origanoides* selecionado e de FFP's contendo compostos fotoprotetores comerciais (g).

FFP	Benzofenona 14%	Octil metoxicinamato 14%	Extrato	Base A/O (g)
O7%	-	7%	-	q.s.p. 0,1
B 3,5%	3,5%	-	-	q.s.p. 0,1
E 10%	-	-	10%	q.s.p. 0,1
O 7% E 10%	-	7%	10%	q.s.p. 0,1
B 3,5% E 10%	3,5%	-	10%	q.s.p. 0,1
O 7% B 3,5%	3,5%	7%	-	q.s.p. 0,1
O 7% B 3,5% E 10%	3,5%	7%	10%	q.s.p. 0,1

### 3.2.7.6 Fator de proteção solar *in vitro* e razão UVA/UVB das FFP's

Cada FFP preparada (0,1 g) foi solubilizada em etanol absoluto, com o auxílio de banho de ultrassom, avolumando-se para 10 mL em balão volumétrico. A solução foi levada ao ultrassom por cinco minutos e em seguida centrifugada por cinco minutos a 6000 rpm. Do sobrenadante, foram retirados 2 mL e avolumados em balão volumétrico para 10 mL com etanol absoluto. Por fim, 1 mL desta última solução foi avolumado para 10 mL, gerando solução final com concentração de 0,2 mg de FFP/mL (DUTRA et al., 2004). A FFP contendo apenas extrato foi analisada nas concentrações de 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/mL.

Para cada amostra foi realizada varredura de absorbância do espectro eletromagnético de 260 a 400 nm (UV), com intervalo de 5 nm, em espectrofotômetro Shimadzu® 1800 controlado pelo programa de computador UV Probe. Foram utilizadas cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico e etanol absoluto como branco, com o qual foi determinada a linha de base. Posteriormente, determinou-se o FPS *in vitro* das formulações e a razão UVA/UVB, como anteriormente.

### 3.2.8 Análise estatística

Teor de fenólicos totais, teor de flavonoides totais, CE<sub>50</sub> do SRL DPPH•, FPS e razão UVA/UVB dos extratos e das formulações passaram por Análise de Variância, pelo teste F e as médias foram comparadas através do teste de Tukey, ambos a 5% de probabilidade de erro. As análises estatísticas foram executadas no programa Sisvar 5.3v. Para avaliar a existência de inter-relação entre as variáveis avaliadas (teores de fenólicos e flavonoides totais, CE<sub>50</sub> DPPH•, FPS e razão UVA/UVB) foi utilizada a correlação de Pearson, em que a correlação é mostrada através do coeficiente de correlação  $r$ , e o teste t de Student ( $p = 0,05$ ) para validar a correlação, além de regressão linear.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Teor de fenólicos totais dos extratos

Organismos aeróbios naturalmente produzem espécies reativas de oxigênio (ERO's) no seu metabolismo que são neutralizadas por enzimas antioxidantes ou outras moléculas de origem endógena ou dietética, como as vitaminas. Ainda assim, uma gama de doenças está ligada direta ou indiretamente a eventos químicos de oxidação de biomoléculas. Mutações podem ser provocadas por dano oxidativo ao DNA, podendo desencadear o câncer. Outro exemplo é a peroxidação das LDL (lipoproteínas de baixa densidade), que permite sua agregação e adesão a parede dos vasos sanguíneos, acarretando a formação de placas de ateroma e o desenvolvimento da aterosclerose. Moléculas antioxidantes podem atuar tanto de maneira profilática quanto terapêutica no combate a muitas disfunções orgânicas (VANNUCCH et al., 1998).

Dentre as substâncias antioxidantes naturais destacam-se os compostos fenólicos, principalmente por sua capacidade estabilizante de ERO's. As propriedades benéficas de muitos alimentos e bebidas têm sido atribuídas à presença destes metabólitos secundários de plantas, com ênfase nos flavonoides, a maior e mais amplamente encontrada classe de compostos fenólicos (BALASUNDRAM et al, 2006).

Os extratos de caule de *L. origanoides* contiveram o teor de fenóis mais elevado, seguidos pelos extratos de inflorescência, folha e raiz (Tabela 3.2). Os elicitores não promoveram diferença comparados ao CT no teor de compostos fenólicos das folhas e das inflorescências. Entre os extratos de caule, os tratamentos FO e SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduziram o teor em cerca de 26%. Apesar de AN ter reduzido cerca de 15% a produção de fenólicos no caule, não houve diferença estatística significativa em comparação a CT. Nos extratos da raiz, os tratamentos SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e FO também promoveram diminuição do teor de compostos fenólicos, 13% e 17%, respectivamente (Tabela 3.2).

Tabela 3.2- Teor de fenólicos totais no extrato metanólico de *L. origanoides* sob elicitação (mg EAG/g).

Tratamento	Folha	Inflorescência	Caule	Raiz
AN	152,2±6,5 <sup>a</sup>	152,9±18,2 <sup>a</sup>	204,9±18,2 <sup>ab</sup>	65,7±1,4 <sup>ab</sup>
FO	153,6±13,1 <sup>a</sup>	196,2±7,5 <sup>a</sup>	178,2±12,0 <sup>b</sup>	57,1±3,0 <sup>c</sup>
SH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	165,5±18,7 <sup>a</sup>	192,6±26,7 <sup>a</sup>	178,2±7,2 <sup>b</sup>	59,1±4,1 <sup>bc</sup>
CT	163,9±8,7 <sup>a</sup>	164,7±6,0 <sup>a</sup>	241,5±20,2 <sup>a</sup>	68,5±2,2 <sup>a</sup>
Média	158,8±12,4	179,6±23,9	200,7±30,1	62,6±5,5
C.V. (%)	7,95	9,54	7,61	4,54

Médias e desvios padrão seguidos pelas mesmas letras na coluna não diferem segundo o teste de Tukey (p<0,05).

C.V.: coeficiente de variação; EAG: equivalente a ácido gálico. AN: *Aspergillus niger*; FO: *Fusarium*

*oxysporum*; SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; CT: controle (água destilada).

Na literatura, existem vários trabalhos quantificando o teor de fenólicos totais nos extratos de *L. origanoides*, principalmente, oriundos de países da América Central, sob a sinonímia de *L. graveolens*. Os fenólicos totais do extrato metanólico das partes aéreas de três populações mexicanas oscilaram entre 212 e 270 mg EAG/g de extrato, com a exclusão prévia da fração apolar por hexano (MARTÍNEZ-ROCHA et al., 2008). García-Bores et al. (2017) verificaram teor maior, de 304 mg EAG/g de extrato metanólico de partes aéreas, em plantas também coletadas no México e sem a fração hexânica. O extrato metanólico de folhas de *Lippia sidoides* Cham. (sin. de *L. origanoides*), coletadas em Minas Gerais, apresentou conteúdo de fenólicos totais equivalentes a ácido tânico (EAT) de 695 mg/g de extrato (FABRI et al., 2011). O extrato etanólico de *Lippia sidoides* (sin. de *L. origanoides*), coletado no Cerrado do Tocantins, apresentou teor de 239 mg EAG/g (TEIXEIRA & GUIMARÃES, 2013). Morais et al. (2008) obtiveram teor de 292,13 mg EAG/g de extrato etanólico das folhas de *Lippia microphylla* Benth. (sin. de *L. origanoides*), coletadas no Ceará. Ao passo que, na Guatemala, no extrato etanólico das folhas obteve-se 55 mg EAG/g de fenólicos totais (CÁCERES et al., 2011).

Além das diferenças metodológicas de extração e quantificação entre os trabalhos, existe a interferência das condições ambientais do local de origem e as variações genéticas do material vegetal (GOOBO-NETO & LOPES, 2007), que podem ter acarretado valores diferenciados para a espécie. Não foram encontrados na literatura estudos comparando o teor nos quatro órgãos da espécie.

O teor de compostos fenólicos mostrou redução no caule e na raiz com todos os tratamentos elicitores testados, principalmente com SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e FO. Outros trabalhos mostram diferentes efeitos do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de elicitores de fungos sobre a produção desses compostos. A irrigação de brotos de lentilha com estimulante comercial a base de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Oxicom) aumentou o conteúdo de fenólicos, exceto no segundo dia, quando algumas concentrações provocaram sua redução (SWIECA, 2015). A adição de elicitor isolado de fungo causou redução da concentração do composto fenólico escopoletina em cultura de células de tabaco, mas não houve efeito do aumento da concentração extracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre o conteúdo desta cumarina (DOREY et al., 1999). Por outro lado, a adição de esporos de fungo aumentou o teor deste mesmo fenólico antifúngico em células de *Ulmus pumila*, mas não em *Ulmus campestris* (VALLE et al., 1997). A elicitação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 1 M, ativou a produção de gliceolina em plântulas de soja.

Os resultados da elicitação sobre o teor de compostos fenólicos totais podem também variar a depender do método de extração empregado. Isto foi constatado por Campos et al. (2004), em que a pulverização com fungo fitopatogênico avirulento em quatro cultivares de feijão apresentou efeitos diferentes e, na maioria, dependentes do solvente extrator. Em AB 136, o tratamento aumentou o teor de fenólicos totais das folhas quando usado metanol ou água como solvente extrator, e reduziu com a extração hidrometanólica. No cultivar Carioca, houve redução do teor em relação ao controle independente do solvente extrator. Ao passo que, no cultivar Macanudo, com a extração metanólica não houve diferença, com a aquosa houve redução e na hidrometanólica, o tratamento com fungo aumentou o teor desses compostos.

A ativação da biossíntese de compostos fenólicos é uma das primeiras etapas no seguimento do processo de defesa da planta após a elicitação. Ela se inicia pela produção do  $H_2O_2$  durante a explosão oxidativa, que ocorre com a detecção do elicitor. Esta espécie ativa de oxigênio, por sua vez, sinaliza entre outras ações a transcrição de genes de enzimas chave na biossíntese de fenilpropanoides, a fenilalanina amônia liase (PAL) e a tirosina amônia liase (TAL). As enzimas, então, catalisam a desaminação dos aminoácidos aromáticos que as nomeiam, em fenilpropanoides precursores dos ácidos fenólicos e vários polifenóis, como os flavonoides (ZHAO et al., 2005).

Ligninas são polímeros, formados a partir de vários monômeros chamados monolignóis e são componentes da parede celular responsáveis por conferir sustentação e resistência, principalmente aos vasos condutores. Durante o ataque de patógenos ou herbívoros, o  $H_2O_2$  ativa e participa do processo de lignificação, como mecanismo de resistência à penetração do patógeno e à destruição dos tecidos. Como os monolignóis são fenilpropanoides derivados do ácido cinâmico, produto da desaminação da fenilalanina pela PAL, a síntese de lignina compete em substrato com a produção de outros compostos fenólicos (RESENDE et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009). Considerando que os órgãos com os altos níveis de lignificação são caule e raiz, a redução dos compostos fenólicos totais nos extratos destes órgãos pode ter ocorrido pelo aumento da síntese deste polímero.

### **3.3.2 Teor de flavonoides totais dos extratos metanólicos**

As folhas apresentaram o maior teor de flavonoides totais (5,4%; m/m), seguidas por inflorescências (4,0%), caule (2,9%) e raiz (0,5%) (Tabela 3.3). O conteúdo de flavonoides nos extratos de folha, inflorescência e caule não variou com o uso dos elicitores. Nos extratos de



raiz, observou-se que o uso de SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promoveu maior teor de flavonoides comparado a AN e FO. O tratamento FO foi o único que diferiu do CT, apresentando redução de cerca de 27%.

Tabela 3.3- Teor de flavonoides totais na matéria seca de *L. origanoides* pulverizada com diferentes elicitores, analisada a partir do extrato metanólicos, expesso em mg EQ/g.

Tratamento	Folha	Inflorescência	Caule	Raiz
AN	51,8±0,4 <sup>a</sup>	18,6±3,2 <sup>a</sup>	27,9±1,5 <sup>a</sup>	5,1±0,2 <sup>bc</sup>
FO	59,2±5,7 <sup>a</sup>	25,1±2,0 <sup>a</sup>	30,9±1,9 <sup>a</sup>	4,1±0,3 <sup>c</sup>
SH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	51,5±4,7 <sup>a</sup>	26,6±6,1 <sup>a</sup>	31,4±3,7 <sup>a</sup>	6,4±0,8 <sup>a</sup>
CT	54,4±6,0 <sup>a</sup>	23,1±0,8 <sup>a</sup>	27,5±2,4 <sup>a</sup>	5,6±0,1 <sup>ab</sup>
Média	54,23±5,2	23,2±4,3	29,4±2,8	5,3±1,0
C.V. (%)	8,76	15,38	8,52	8,28

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não possuem diferença significativa, segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). C.V.: coeficiente de variação; EQ: equivalente a quercetina. AN: *Aspergillus niger*; FO: *Fusarium oxysporum*; SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; CT: controle (água destilada).

Teixeira & Guimarães (2013), usando nitrato de alumínio como reagente, detectaram teor de flavonoides de 87 mg EQ/g de extrato etanólico de folhas coletadas no Tocantins. Martínez-Rocha et al. (2008) encontraram valores mais elevados de flavonoides totais em três populações mexicanas, de 136 a 200 mg equivalentes a Catequina (EC)/g de extrato metanólico, sem a fração de hexano. A análise de oito acessos do banco de germoplasma da Universidade Federal de Minas Gerais quantificou o teor de flavonoides totais extraídos com etanol e água, encontrando valores ainda mais elevados entre 115 a 417 mg equivalentes a Rutina (ER)/g de material vegetal (SOUZA, 2015). Coelho et al. (2015) identificaram a flavanona naringenina na concentração de 37 mg/g de extrato hidroetanólico da parte aérea, correspondendo a 11 mg/g de material vegetal, o que é mais da metade do total de flavonoides quantificados nas folhas (Tabela 3.3). Entretanto, a diversidade de metodologias e de padrões utilizados, principalmente nesta avaliação, é bastante grande. Muitos trabalhos não realizam a quantificação de flavonoides totais por espectroscopia, mas sim dando preferência a técnicas mais sofisticadas e precisas, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) associada a diferentes detectores, identificando e quantificando flavonoides ou classes específicas.

Quanto aos tratamentos, vários trabalhos têm mostrado a ação de elicitores bióticos e abióticos sobre o conteúdo de flavonoides, principalmente de compostos específicos. Em plantas de *L. sidoides* (sin. de *L. origanoides*) cultivadas em Minas Gerais, o conteúdo relativo de flavonoides reduziu a medida que o nível de déficit hídrico aumentou, indo de 0,0139 a 0,008 g/g de matéria seca (ALVARENGA et al., 2011). Conceição et al. (2006) elicitaram culturas de células de *Hypericum perforatum* L. com metil jasmonato (MJ), ácido salicílico (AS) e elicitor de fungo fitopatogênico e observaram que, enquanto o MJ ativou o aparecimento de flavonas,

todos os elicitores promoveram a redução de flavonóis, em alguns casos por completo. Entretanto, outro estudo com a mesma cultura demonstrou que a elicitação com ácido jasmônico (AJ) aumentou o conteúdo de flavonóis, independente da concentração (GADZOVSKA et al., 2007). Daayf et al. (2003) demonstraram que o tempo de coleta após o estímulo determinou grande variação no conteúdo de flavanas em calos de palma (*Phoenix dactylifera*) tratados com elicitador de *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*, com pico de produção no quinto dia e redução ao nível do controle no vigésimo.

Os trabalhos citados acima demonstram que o tipo e a concentração/intensidade do elicitador, assim como a época de análise após a aplicação podem determinar o sucesso da estimulação da produção de metabólitos de interesse (VASCONSUELO & BOLAND, 2007). A tendência de aumento percebida no teor de flavonoides do extrato da raiz e os valores numericamente maiores nos flavonoides de folha, inflorescência e caule e nos fenólicos de folha e inflorescência com o uso de FO e/ou SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, podem sugerir que em algum momento antes ou após o dia da colheita esses tratamentos teriam estimulado a produção dos metabólitos avaliados de maneira mais expressiva. Por ser o primeiro trabalho com a espécie, o foco deste estudo foi identificar agentes capazes de promover alteração na composição química e propriedades da mesma. Desta forma, fazem-se necessários estudos posteriores que avaliem o efeito cinético e dose-dependente destes dois elicitores para se constatar a condição ótima para a espécie e para cada órgão.

### 3.3.3 Atividade antioxidante dos extratos metanólicos

A atividade antioxidante dos extratos metanólicos de folhas e inflorescências de *L. origanoides* pelo teste de SRL (DPPH•) não variou estatisticamente entre os tratamentos para os extratos de folha e inflorescência (Tabela 3.4). Nos extratos do caule, todos os elicitores tenderam ao aumento da ação antioxidante, no entanto, apenas FO mostrou-se estatisticamente diferente do CT. Nos extratos da raiz, por outro lado, pode-se observar uma tendência para a redução da atividade de SRL, em especial com o uso de AN e SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 33% e 53%, respectivamente, relativa ao CT (Tabela 3.4).

Tabela 3.4- Atividade de sequestro de radical livre DPPH• (%SRL) do extrato metanólico de *L. origanoides* pulverizada com diferentes elicitores.

Tratamento	CE50 (µg/mL)			
	Folha	Inflorescência	Caule	Raiz
AN	56,5±2,0 <sup>a</sup>	66,9±8,9 <sup>a</sup>	55,0±8,4 <sup>ab</sup>	149,3±5,0 <sup>b</sup>
FO	59,2±7,2 <sup>a</sup>	63,9±2,4 <sup>a</sup>	46,9±2,0 <sup>a</sup>	147,9±13,3 <sup>ab</sup>
SH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	52,9±5,8 <sup>a</sup>	58,8±3,7 <sup>a</sup>	54,5±4,3 <sup>ab</sup>	171,5±22,5 <sup>b</sup>
CT	62,7±1,5 <sup>a</sup>	52,9±9,1 <sup>a</sup>	69,9±7,5 <sup>b</sup>	112,1±8,7 <sup>a</sup>
Média	57,8±5,6	60,6±8,0	56,6±10,1	145,2±25,2
Ácido ascórbico	0,66			
C.V. (%)	8,29	11,12	10,81	9,65

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não possuem diferença significativa, segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). CE50: Concentração de eficiência média. C.V.: coeficiente de variação. AN: *Aspergillus niger*; FO: *Fusarium oxysporum*; SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; CT: controle (água destilada).

García-Bores et al. (2017) observaram atividade elevada do extrato metanólico das partes aéreas obtidas no México, excluída a fração hexânica, com CE<sub>50</sub> frente a DPPH• de 22 µg/mL, eficiência esperada se contar o elevado conteúdo de fenólicos totais presente no extrato (304 mg EAG/g). Resultado ainda melhor foi obtido por Fabri et al. (2011) com extrato metanólico de folhas coletadas em Minas Gerais, cuja CE<sub>50</sub> de 5 µg/mL foi coerente com os conteúdos altos de fenólicos e flavonoides totais detectados (695 mg EAT/mg e 229 mg ER/g de extrato). Outros extratos apresentaram resultados diferentes, a exemplo de Morais et al. (2013) que observaram correlação entre a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos do extrato etanólico da parte aérea coletada no Ceará, apesar de a CE<sub>50</sub> ter sido elevada (2,39 mg/mL) quando considerada a quantidade de fenólicos detectada (292 mg EAG/g de extrato). O extrato etanólico de folhas provenientes da Guatemala apresentou CE<sub>50</sub> de 0,136 mg de extrato/mL, sendo o conteúdo de compostos fenólicos igual a 56 mg EAG/g de extrato (CÁCERES et al., 2011). No presente trabalho, não foi observada esta correspondência entre os extratos com maior atividade antioxidante e aqueles com maior conteúdo de compostos fenólicos, pelo contrário, o extrato do caule de CT apresentou a maior CE<sub>50</sub>, mesmo tendo o teor de fenólicos mais elevado. Para analisar melhor esta relação, fez-se a análise de correlação de Pearson, seguida de análise de regressão linear entre teor de fenólicos e flavonoides totais e a CE<sub>50</sub> de caule e raiz, que apresentaram valores estatisticamente diferentes de SRL entre os tratamentos (Figura 3.9).

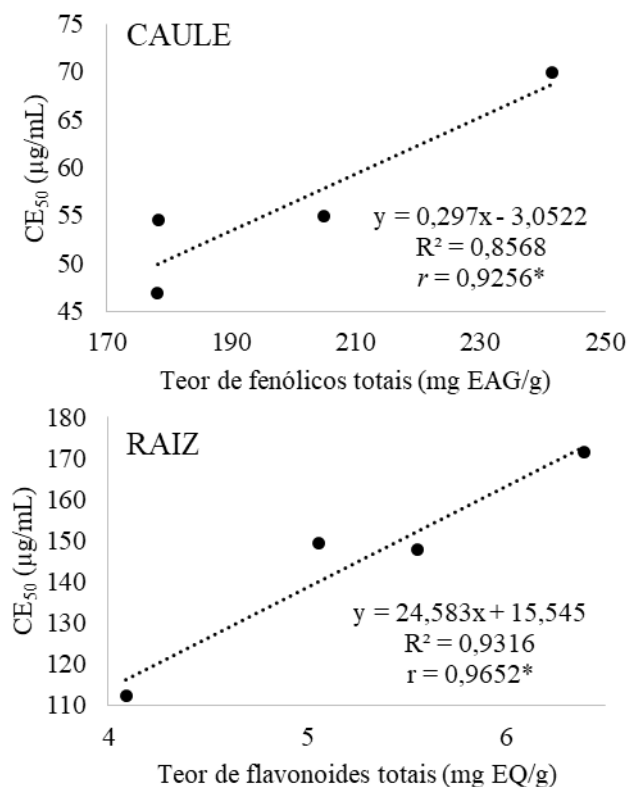


Figura 3.9- Correlação entre as médias de teor de compostos fenólicos totais Equivalentes a Ácido Gálico (EAG) e de flavonoides totais Equivalentes a Quercetina (EQ) e as médias da Concentração de eficiência média (CE<sub>50</sub>) dos extratos de *L. origanoides* sob elicitación.

A análise de correlação de Pearson determina o quanto duas variáveis são interligadas, e é representada pelo coeficiente de correlação  $r$ . Este coeficiente pode variar de 1 (alta correlação positiva) a -1 (alta correlação negativa), sendo zero igual à ausência de correlação. Através da análise de regressão linear, pode-se visualizar essa correlação graficamente, podendo apresentar gráfico ascendente ( $r$  positivo), descendente ( $r$  negativo) ou os dados podem não se ajustar a uma reta ( $r$  próximo a zero) (ROCHA, 2014).

Foi constatada correlação significativa entre o teor de flavonoides totais e a CE<sub>50</sub> DPPH• nos extratos de raiz e entre o teor de compostos fenólicos totais e a CE<sub>50</sub> DPPH• para o extrato de caule (Figura 3.9). Entretanto, estas correlações apresentaram  $r$  positivo, curva ascendente, indicando que a CE<sub>50</sub> aumenta com o aumento do conteúdo destes compostos antioxidantes.

De forma semelhante, Souza (2015) observou que, entre os oito acessos de *L. origanoides* avaliados, conforme os teores de flavonoides totais tornavam-se maiores, as CE<sub>50</sub> apresentavam-se mais elevadas. Por exemplo, enquanto o acesso 6 apresentou 417 mg ER/g e CE<sub>50</sub> de 44 µg/mL, o acesso 1 mostrou 115 mg ER/g e CE<sub>50</sub> de 27 µg/mL.

Por outro lado, Lim et al. (2013) constataram correlação positiva entre o conteúdo destes compostos e capacidade antioxidante equivalente ao 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-

carboxílico (Trolox) ( $r = 0,96$ ) e negativa entre o teor e a  $CE_{50}$  DPPH• ( $r = -0,85$ ). Pelos respectivos gráficos de regressão, observou-se o aumento do teor de compostos fenólicos ligado ao aumento da capacidade antioxidante e da eficiência do SRL em *Orthosiphon stamineus* tratadas com diferentes tipos de elicitores. Este padrão de correlação entre essas variáveis é o esperado, tendo em vista que a estrutura do fenol, anel benzênico com hidroxilas substituintes dos hidrogênios, confere a compostos que os possui alta capacidade doadora de elétrons e  $H^+$  a radicais livres, levando a estabilização destes agentes oxidantes (RICE-EVANS et al., 1997).

Algumas características estruturais determinam a capacidade sequestradora de radicais livres dos diversos compostos fenólicos, influenciando na capacidade de doar elétrons para radicais livres e formar um radical fenólico estável. Estruturas que fornecem hidrogênio e que permitem a ressonância do elétron não pareado através dos anéis aromáticos aumentam a capacidade antioxidante do composto fenólico. Segundo Rice-Evans et al. (1996), entre os ácidos fenólicos, a quantidade e a posição de grupos hidroxila e metoxila substituintes de hidroxila são os principais determinantes desta atividade. Entre os flavonoides, as estruturas determinantes são o grupo hidroxila na posição 3 do anel heterocíclico (anel C) (Figura 3.10A), a dupla ligação 2-3 juntamente com a função 4-oxo no anel C (Figura 3.10B), a estrutura *o*-di-hidroxi no anel B (Figura 3.10C), e os grupos 3-OH (anel C) e 5-OH (anel A) associados à função 4-oxo no anel C (Figura 3.10D). O anel C de antocianidina (Figura 3.10E) e a polimerização (Figura 3.10F) também conferem elevada atividade antioxidante. Por outro lado, a glicosilação reduz a capacidade de flavonoides em relação a suas agliconas (Figura 3.10G).

A partir disso, é sugerido que os tratamentos que renderam menor teor de compostos fenólicos ou flavonoides nos extratos de caule e raiz, promoveram a síntese de fenólicos com maior capacidade antioxidante, justificando a correlação positiva detectada entre teor e  $CE_{50}$  DPPH• nestes extratos. No entanto, esta hipótese só poderá ser confirmada ou rejeitada após a realização de análise dos extratos, *a posteriori*, por técnicas mais refinadas, como a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de diodo (CLAE-DAD).

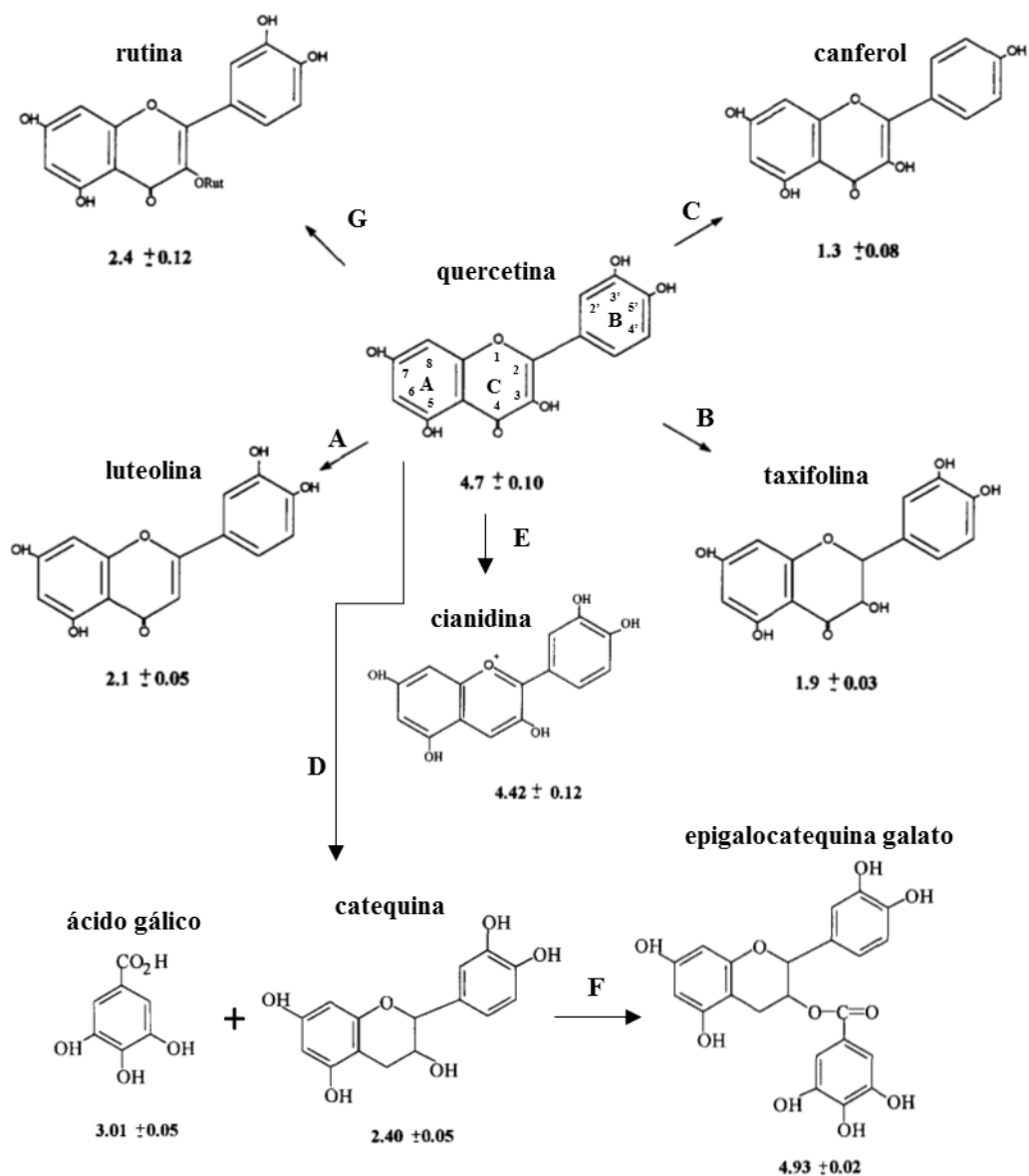


Figura 3.10- Influência de diferenças moleculares entre flavonoides sobre sua capacidade antioxidante equivalente ao 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox). Imagem modificada a partir de Rice-Evans et al. (1996).

### 3.3.4 Atividade fotoprotetora

#### 3.3.4.1 Espectro de absorção no UV dos extratos metanólicos

A atividade fotoprotetora consiste na capacidade de uma substância de bloquear a incidência da radiação ultravioleta (UV) em uma superfície, através da sua propriedade de reflexão ou de absorção dos raios solares nesta faixa de comprimento de onda. Os fotoprotetores

orgânicos geralmente agem absorvendo radiação UV e dissipando em um comprimento de onda menos energético, mais longo, como o infravermelho (calor) e a luz visível (FLOR et al., 2007).

Através das curvas de absorção em todos os tipos de radiação UV (UVC, UVB e UVA) mostradas na figura 3.11, pôde-se identificar as faixas de maior absorbância dos extratos a 100 mg/L (CT). Dentre eles, o extrato de inflorescência apresentou maior absorbância, seguido pelos extratos de folha, caule e raiz. Os picos de maior absorção dos três primeiros encontram-se entre a radiação UVC e UVB (260 – 310; 260 – 305; 270 – 310 nm, respectivamente). O extrato de raiz apresentou um pico de baixa absorção entre 310 e 345 nm (Figura 3.11). Os comprimentos de onda máximos de absorção dos extratos da inflorescência e do caule foram em 285 nm (1,146 e 0,642, respectivamente), os de folha em 275 nm (0,876) e os de raiz foi em 330 nm (0,432). Porém, todos os extratos apresentaram absorbância considerável até 365 nm (UVA) (Figura 3.11).

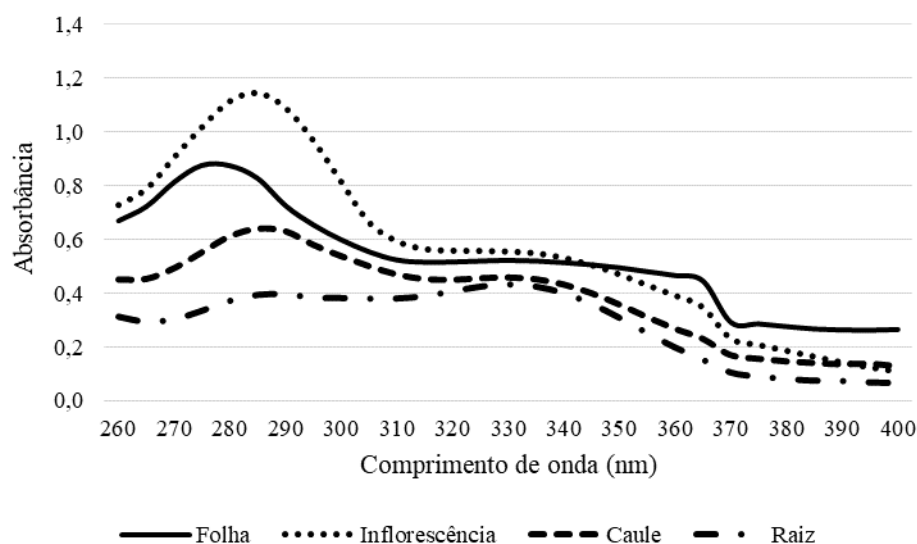


Figura 3.11- Espectro de absorção no UV dos extratos metanólicos de *L. origanoides* Kunth (grupo CT).

O espectro de absorção dos extratos de folha, inflorescência e caule estão em conformidade com os resultados obtidos por García-Bores et al. (2017) para *L. graveolens* (sin. *L. origanoides*), que analisaram solução do extrato metanólico, sem a fração hexânica, das partes aéreas coletadas no México. Os picos de maior absorção localizaram-se entre 260 e 310 nm, com suave ombro em 330 nm e o comprimento máximo em 280 nm. A absorção máxima do extrato atingiu 0,9 em uma concentração de 50 µg/mL em MeOH, muito acima do observado para nossos dados de inflorescência, folha e caule (0,573, 0,438 e 0,322, respectivamente), o

que é justificado pelo alto teor de compostos fenólicos encontrados no extrato mexicano (304 mg EAG/g).

De toda a radiação eletromagnética emitida pelo Sol, apenas parte atravessa a atmosfera e atinge a superfície da Terra (Figura 3.12). Grande parte desta radiação é composta por luz visível e radiação infravermelha, sendo apenas de 5 a 10% radiação UV. Entretanto, esta radiação apresenta elevada frequência e comprimento de onda menores, o que a torna bastante energética (NASCIMENTO et al., 2014).

Do espectro UV, a radiação UVC (200-280 nm) é a mais energética, porém, ela é totalmente absorvida pelos gases e partículas em suspensão da atmosfera da Terra (Figura 3.12). A radiação UVB (280 a 320 nm) é a mais agressiva que alcança a superfície da Terra, correspondendo a apenas 5% do total. Ela penetra na epiderme acarretando reações fotoquímicas responsáveis pela síntese de vitamina D, porém, também provoca as queimaduras agudas, vermelhidão, envelhecimento precoce e danos ao material genético das células da pele, podendo levar ao câncer. A radiação UVA (320 a 400 nm), por sua vez, é a menos energética e que atinge a superfície em maior abundância (95%). Ela penetra mais profundamente, até a derme, e é responsável pelo escurecimento da melanina causando o bronzeamento da pele, porém ela também causa danos ao sistema vascular periférico e danos no material genético, levando ao câncer (FLOR et al., 2007).

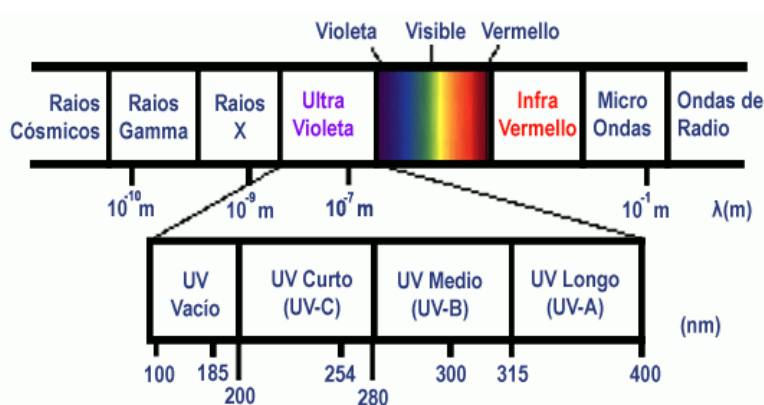


Figura 3.12- Espectro de radiação eletromagnética (INSTITUTO DE FÍSICA, 2017).

Assim, para um composto possuir atividade fotoprotetora de interesse, o pico de absorção eletromagnética deve estar entre a faixa do UVB e do UVA (280-400 nm). Os extratos da parte aérea apresentaram apenas metade do pico de absorção máxima na região do UVB, entretanto, os comprimentos de onda UVB mais baixos são os mais energéticos que alcançam a superfície terrestre, sendo de grande interesse a proteção nesta região. O extrato de raiz



apresentou absorção máxima no UVA. Além disso, todos os extratos apresentam absorbância considerável até 365 nm, compreendendo toda a região UVB e a maior parte da UVA.

Em relação aos tratamentos, pode-se observar que os extratos de caule apresentaram a maior amplitude de valores de absorbância entre os tratamentos, e os extratos das raízes apresentaram a menor amplitude (Figura 3.13). Em folha e inflorescência, os extratos do tratamento SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentaram valores de absorbância acima dos demais, enquanto FO mostrou o mais abaixo. No caule, o extrato de tratamento SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também apresentou a absorbância mais elevada e o extrato de CT possuiu absorbância abaixo de todos os tratamentos elicitores (Figura 3.13). Na raiz, o extrato de CT apresentou valores acima dos demais tratamentos, os quais se mostraram bastante parecidos (Figura 3.13).

Estes espectros de absorção sugerem que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promove o aumento da biossíntese de compostos com atividade fotoprotetora nas partes aéreas da planta. Segundo Nascimento et al (2014), os compostos orgânicos com ação fotoprotetora apresentam anéis benzênicos contendo substituintes, sendo pelo menos, um doador e um atrator de elétrons nas posições *orto* e *para*, pois assim aumentam a ressonância eletrônica da molécula. Algumas classes de metabólitos fotoprotetores são flavonoides, alcaloides, taninos e tocoferóis.

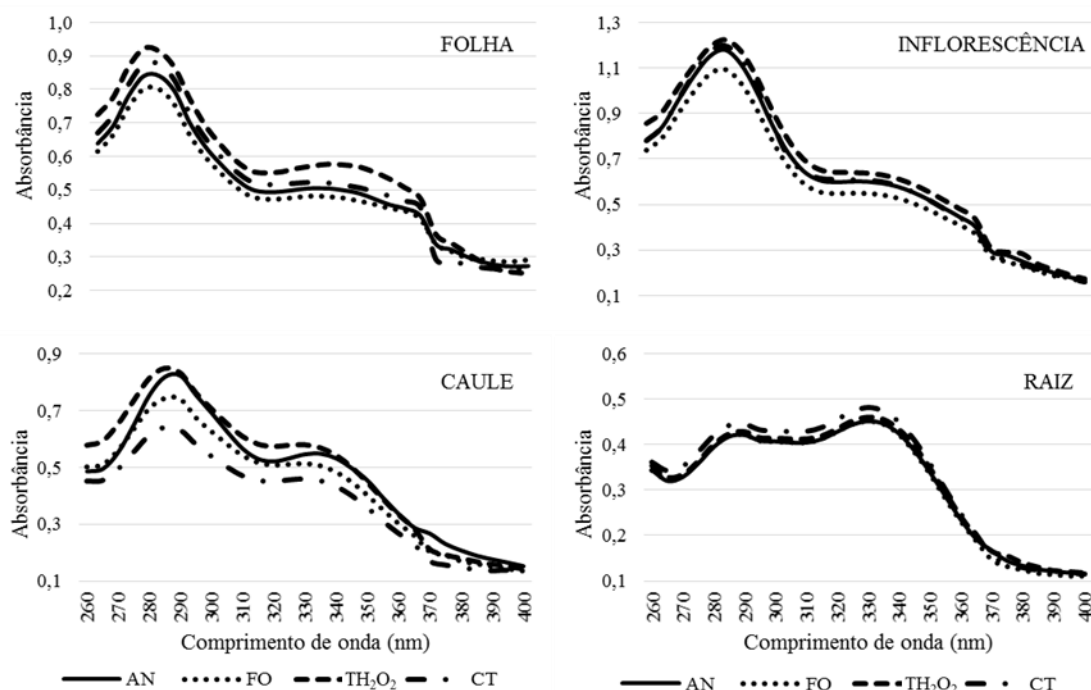


Figura 3.13- Espectro de absorção no UV dos extratos metanólicos de *L. origanoides* sob elicitação. AN: *Aspergillus niger*; FO: *Fusarium oxysporum*; SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; CT: controle (água destilada).

A razão UVA/UVB dos extratos de todos os órgãos revelou que a área do espectro de absorção no UVA é maior que a área de absorção no UVB, apesar de os extratos de folha,

inflorescência e caule apresentarem parte do pico máximo de absorção no UVB (Tabela 3.5). Os extratos de folha apresentaram a maior média, seguidos por raiz, caule e inflorescência. Para folha, os elicitores provocaram o aumento da razão UVA/UVB, porém, apenas FO foi diferente do CT. Para caule, AN aumentou essa razão enquanto SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e FO reduziram, porém, apenas SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diferenciou-se do CT. A Razão UVA/UVB dos extratos da inflorescência e da raiz não se alterou entre os tratamentos (Tabela 3.5). O aumento deste parâmetro pode significar o aumento da absorção no UVA ou a redução no espectro UVB, tendo em vista que é um cálculo relativo a proporção.

Tabela 3.5- Razão UVA/UVB dos extratos metanólicos de *L. origanoides* sob elicitação.

Tratamentos	Folha	Inflorescência	Caule	Raiz
AN	1,94±0,01 <sup>ab</sup>	1,31±0,00 <sup>a</sup>	1,49±0,01 <sup>a</sup>	1,60±0,03 <sup>a</sup>
FO	2,00±0,01 <sup>a</sup>	1,30±0,02 <sup>a</sup>	1,42±0,01 <sup>bc</sup>	1,57±0,06 <sup>a</sup>
SH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,94±0,01 <sup>ab</sup>	1,32±0,02 <sup>a</sup>	1,41±0,02 <sup>c</sup>	1,62±0,02 <sup>a</sup>
CT	1,87±0,04 <sup>b</sup>	1,29±0,03 <sup>a</sup>	1,47±0,01 <sup>ab</sup>	1,58±0,00 <sup>a</sup>
Média	1,76	1,25	1,45	1,59
C.V. (%)	1,76	1,25	1,40	1,42

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não possuem diferença significativa, segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). C.V.: coeficiente de variação. AN: *Aspergillus niger*; FO: *Fusarium oxysporum*; SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; CT: controle (água destilada).

A análise estatística detectou correlação linear significativa apenas para os extratos de caule, entre o teor de flavonoides totais e a razão UVA/UVB (Figura 3.14). A correlação foi negativa, demonstrando que o aumento da concentração destes compostos reduz a razão UVA/UVB destes extratos. Os extratos de SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e FO apresentaram os menores valores de razão UVA/UVB e as maiores médias de teor de flavonoides (31 mg EQ/g), apesar de não ter sido significativo pelo teste de média. Estes tratamentos podem ter estimulado a produção de flavonoides com reduzida absorvância na banda I (320 – 385) do espectro dos flavonoides, que corresponde ao anel B, e pronunciada na banda II (250 – 285), referente ao anel A. As flavanonas têm espectro com estas características, devido a saturação do anel heterocíclico C, o que impede a ressonância eletrônica entre o anel A e o B pela ausência de dupla ligação entre os carbonos das posições 2 e 3, no anel C (RICE-EVANS et al., 1996).

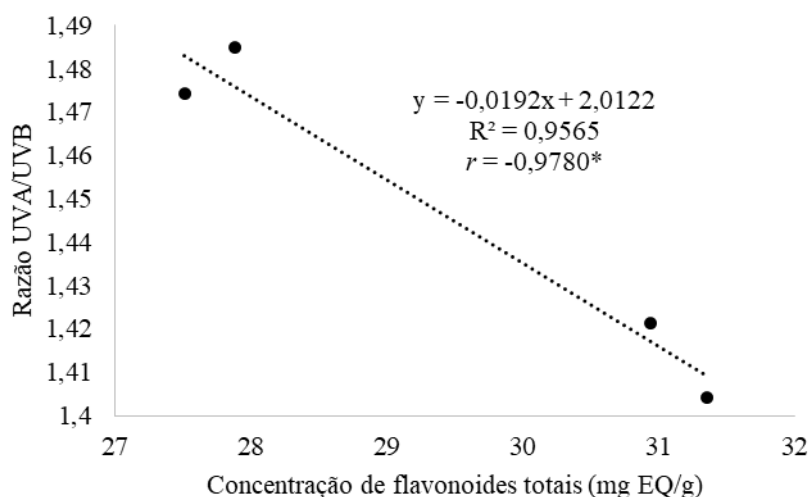


Figura 3.14- Correlação entre a razão UVA/UVB e o teor de flavonoides totais Equivalentes a Quercetina (EQ) dos extratos metanólicos do caule de *L. origanoides* sob elicitação. R<sup>2</sup>: coeficiente de explicação; r: coeficiente de correlação; \*Significativo pelo teste t de Student (p < 0,05).

#### 3.3.4.2 Fator de Proteção Solar *in vitro* dos extratos metanólicos

A determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro* trata-se do segundo passo do protocolo de investigação de novas fórmulas fotoprotetoras (NASCIMENTO et al., 2014). Segundo Velasco et al. (2011), testes *in vitro* são importantes ferramentas na triagem de novos agentes, como forma de seleção para os testes *in vivo*. A metodologia desenvolvida por Mansur et al. (1986) utiliza uma equação para relacionar a absorbância obtida em espectrofotômetro à resposta fotoprotetora UVB obtida em ensaios *in vivo*.

Na figura 3.15 são apresentados os FPS's apenas das soluções mais concentradas, a 100 mg/L. Os FPS's de todos os extratos de inflorescência apresentaram valores acima do mínimo determinado pela Anvisa (FPS 6) com média de 7,2 (Figura 3.15). Os extratos de caule mostraram a segunda melhor média de FPS de 6,0, seguidos pelos extratos de folha com 5,6 e de raiz com média de 3,7 (Figura 3.15). Dentre os extratos de caule, a aplicação de todos os elicitores promoveu aumento da atividade fotoprotetora UVB (SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 6,6; AN: 6,3; FO: 5,9), porém FO não diferenciou do CT (FPS 5,1). Na inflorescência, a aplicação de SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentou o FPS do extrato de 7,1 para 8,1. Nos extratos de folha e raiz não houve diferença detectável (Figura 3.15). Na figura 3.16 verifica-se para os extratos de todos os órgãos que há coerência entre o aumento da concentração e o da atividade fotoprotetora, demonstrando uma relação dose-dependente.

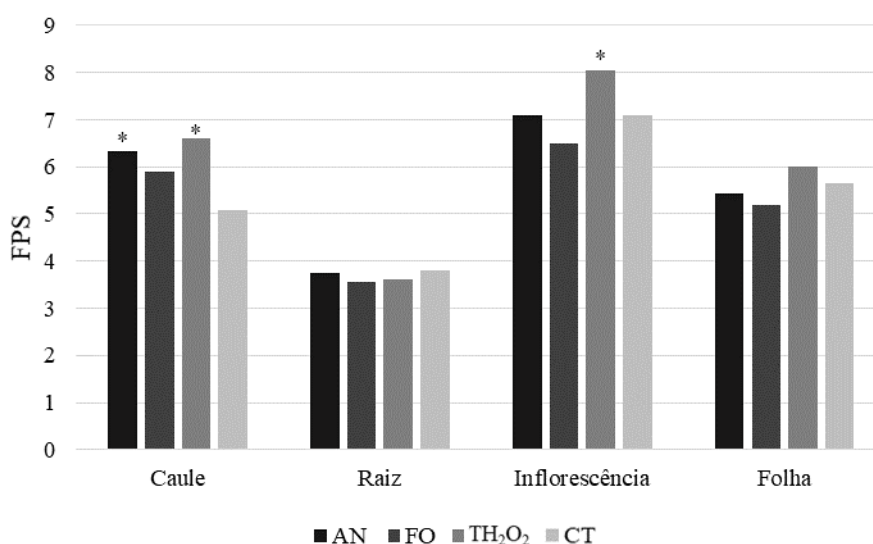


Figura 3.15- Fator de proteção solar (FPS) *in vitro* dos extratos metanólicos de *L. organoides* sob eliciação (soluções a 100 mg/L). \*Médias diferem do CT, segundo teste Tukey ( $p < 0,05$ ). AN: *Aspergillus niger*; FO: *Fusarium oxysporum*; SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; CT: controle (água destilada).

O fato de os extratos de folha terem apresentado menor FPS que os extratos de caule se deve ao leve deslocamento para a região UVC da absorvância máxima das folhas, o que reduziu sua proteção UVB.

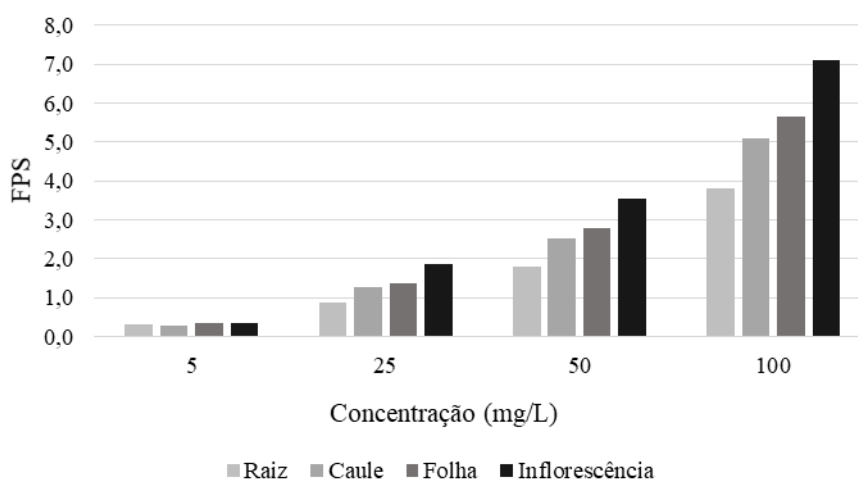


Figura 3.16- Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro* dos extratos metanólicos de *L. organoides* em função da concentração (grupo CT).

O extrato metanólico das partes aéreas da espécie foi também investigado por García-Bores et al. (2017), avaliando a atividade fotoprotetora *in vivo* em ensaios com bactérias e com cobaias. No primeiro, o extrato a 2 mg/mL em EtOH 70% apresentou atividade fotoprotetora retardando a morte de células de *E. coli* expostas à radiação UV por 150 minutos, semelhante ao metoxicinamato de octila, enquanto, as bactérias sem proteção morreram com apenas seis

minutos. No segundo ensaio, o extrato a 2 mg/mL protegeu a pele de ratos da fotocarcinogênese induzida pela exposição crônica à radiação UV, reduzindo o número de injúrias de 28,1 para 1,2 por animal e a ocorrência de lesões de 100% para 40% dos animais, em comparação com animais não protegidos, após 30 dias de exposição. Outro estudo também detectou atividade inibidora da genotoxicidade causada pela irradiação UVA-UVB sobre células de *E. coli* de extrato de folha e inflorescências, obtido por CO<sub>2</sub> supercrítico, de seis populações coletadas na Colômbia. Uma delas apresentou baixa concentração inibitória (65 µg/mL), além de não ter efeito citotóxico observado (FUENTES et al., 2017). Esses resultados e os atuais demonstram o alto potencial da espécie para uso comercial também como componentes de cosméticos.

Como havia sido sugerido pelas curvas de absorção UV da figura 3.13, o SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elicitou a atividade fotoprotetora nos órgãos aéreos. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é uma molécula sinalizadora chave de vários processos durante a reação de defesa da planta. Além da ativação das enzimas tirosina amônia liase (TAL) e fenilalanina amônia liase (PAL) e da participação na síntese de lignina, mencionadas anteriormente, esta molécula altera o estado redox intracelular que acarreta a ativação de genes de defesa. É também um sinalizador determinante para a síntese dos hormônios ácido jasmônico e ácido salicílico, os quais desencadeiam a ativação de diferentes genes de defesa (ZHAO et al., 2005). Este tratamento pode ter estimulado a síntese de compostos como taninos, biflavonoides, tocoferóis e tocotrienóis que apresentam potencial atividade fotoprotetora (NASCIMENTO et al., 2014).

Na busca por ativos fotoprotetores produzidos de forma natural, a elicitação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se mostra uma técnica potencial para a otimização da produtividade de plantas cultivadas para este fim. Porém, estudos complementares são necessários para identificar o(s) composto(s) ativo(s) que foram elicitados e observar o efeito de diferentes doses e épocas de coleta sobre o sua biossíntese e a produtividade do cultivo nos parâmetros agrônômicos.

#### 3.3.4.3 Espectro de absorção no UV e fator de proteção solar das FFP's

Segundo Guaratini et al. (2009), no mercado de protetores solares é crescente a busca por novos princípios ativos, principalmente de origem natural. Apesar disso, apenas 3% dos 111 registros de patentes internacionais analisados pelos autores na área de fotoproteção refere-se a novos ativos. No Brasil, essa porcentagem subiu para 12%. Parte do motivo se deve ao fato de agentes naturais apresentarem baixa capacidade fotoprotetora em relação aos sintéticos, assim, sendo úteis como coadjuvantes destes últimos (NASCIMENTO et al., 2014). A Anvisa autoriza o uso de 38 filtros UV em sua resolução nº 47 (BRASIL, 2006) contendo a Lista de

Filtros Ultravioletas Permitidos para Produtos de Higiene Pessoais, Cosméticos e Perfumes. Apesar de os ativos das FFP's no Brasil estarem restritos aos desta lista, é permitida a adição de antioxidantes às formulações, que, a depender da molécula, podem resultar no aumento do FPS (GUARATINI et al., 2009).

A partir dos resultados obtidos, o extrato selecionado para o preparo das FFP's foi o do tratamento SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da inflorescência, por ter apresentado FPS médio de 8,1 (Figura 3.15). As formulações contendo o extrato apresentaram cor marrom-amarelada e odor herbal suave, próximo ao da própria inflorescência. Entretanto, não foi possível realizar as análises organolépticas, características físico-químicas e de estabilidade da formulação devido à pouca quantidade disponível do extrato.

Analisando a figura 3.17, observa-se que não houve alteração expressiva da curva de absorção no UV da formulação contendo 10% de extrato metanólico da inflorescência do tratamento SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (E10%), comparada à curva do extrato puro diluído (Figura 3.13). Além disso, observa-se decaimento da altura entre as curvas de absorbância coerente com a redução da concentração da solução de FFP.

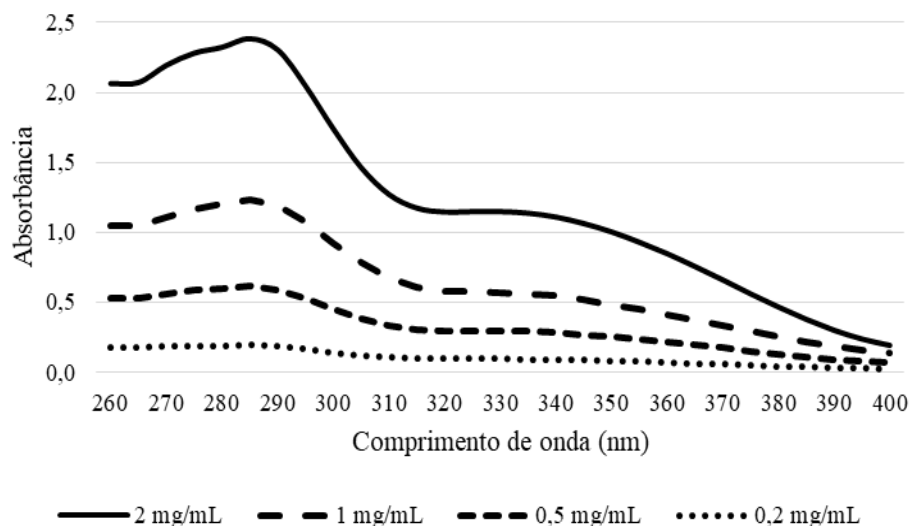


Figura 3.17-Espectro de absorção no UV da formulação fotoprotetora contendo 10% de extrato metanólico de inflorescência de *L. organoides* elicitada com peróxido de hidrogênio (0,5 M) em base O/A (oleosa/aquosa).

Comparando-se os espectros da FFP E10% com o da FFP com 3,5% de benzofenona (B3,5%) na figura 3.18, pode-se perceber certa semelhança no padrão de absorção entre elas, apresentando pico máximo em torno de 285 nm com ombro na região UVB estendendo-se até a região UVA. Esta semelhança pode estar associada à presença de flavonoides no extrato. A benzofenona (Figura 3.8) e os flavonoides (Figura 3.10) apresentam dois anéis aromáticos, que

absorvem em comprimentos de onda diferentes no UV. A formulação contendo 7% de metoxicinamato de octila (O7%), por outro lado, apresenta o pico de absorção máxima em 310 nm e quase não absorve grande radiação de grande parte do espectro UVA (Figura 3.18). A FFP contendo ambos os filtros fotoprotetores apresenta dois picos ligados, um em 295 e o outro em 315 nm, absorvendo também em apenas parte da faixa do UVA. Dentre as formulações sem o extrato, esta última apresentou as absorbâncias máximas mais elevadas, seguida por O7%. A adição do extrato às formulações com os fotoprotetores comerciais, separadamente ou em associação, aumentou a absorção das FFP's, principalmente nas regiões de 275 a 310 nm e de 320 a 370 nm (Figura 3.18).

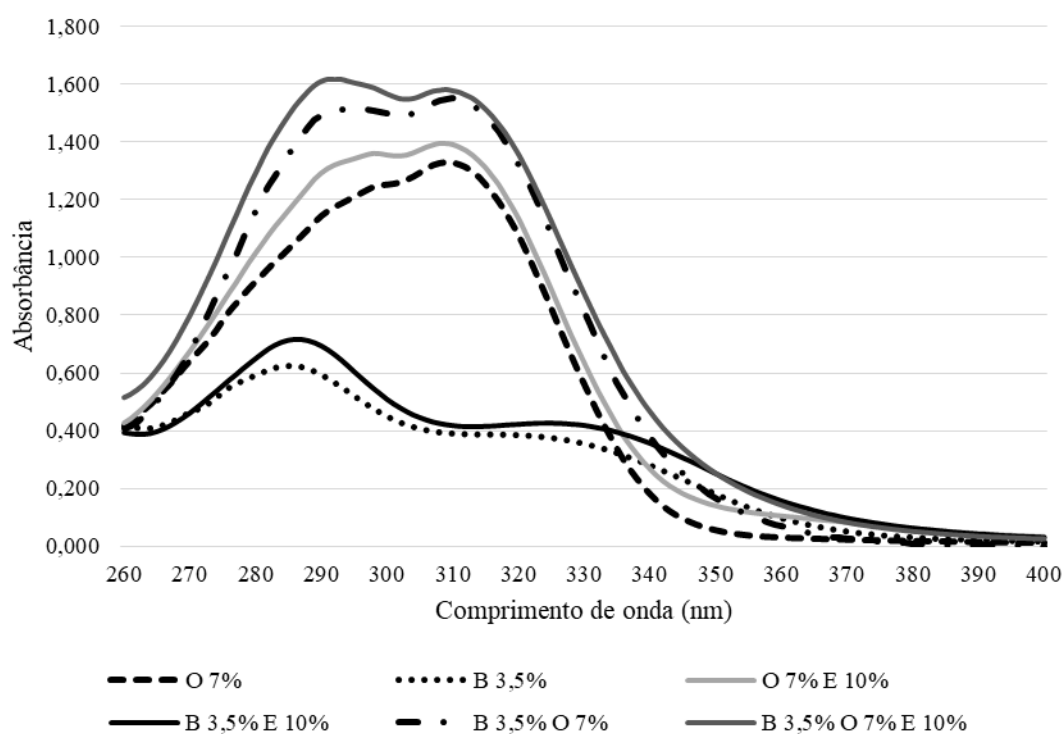


Figura 3.18- Espectro de absorção no UV de formulações fotoprotetoras (FFP) a 0,2 mg/mL contendo benzofenona a 3,5%, metoxicinamato de octila a 7% e/ou extrato metanólico de inflorescência de *L. origanoides* a 10% elicitada com peróxido de hidrogênio a 0,5 M (SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

O FPS da formulação E10% na concentração de 0,2 mg/mL foi de 1,25 (Figura 3.19), um pouco abaixo do estimado quando observado o valor para o extrato puro na solução de 25 mg/L, que foi de 2,1. O FPS desta formulação mostrou correspondência com o aumento da concentração da solução, ou seja, uma relação dose-dependente. O aumento da atividade proporcional à concentração da solução de E10% pode ser comparado à elevação do FPS de filtros comerciais em função da quantidade aplicada, cujo FPS determinado no rótulo só é alcançado com a correta aplicação do produto, como mostra o quadro 3.5 (NASCIMENTO et

al., 2014). As concentrações testadas não correspondem às quantidades de filtro solar apresentadas no quadro, apenas mostram o efeito dose-dependente das FFP's.

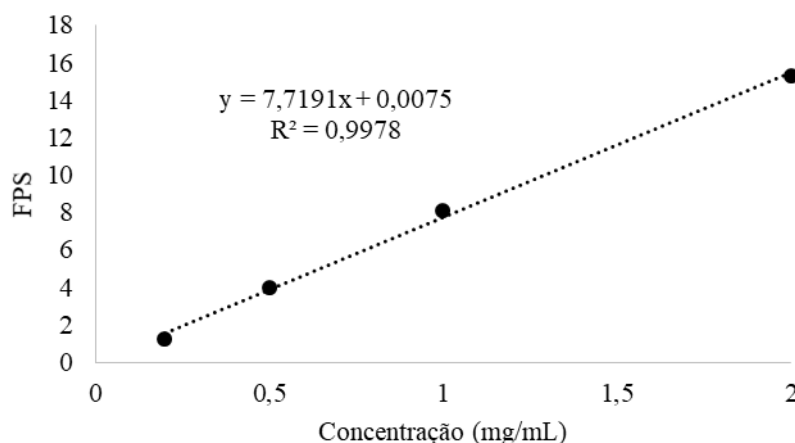


Figura 3.19- Fator de proteção solar *in vitro* de formulação fotoprotetora contendo 10% de extrato metanólico de inflorescência de *L. origanoides* sob elicitação com peróxido de hidrogênio em base O/A (oleosa/aquosa).

Dentre as FFP's sem o extrato (Tabela 3.6), a formulação O7%B3,5% apresentou o FPS mais elevado (15,1), coerente com o aumento da altura e da largura da curva de absorção na região do UVB obtida com a mistura dos dois filtros. O segundo maior FPS foi da O7% (12,7). A adição do extrato aumentou a FPS de ambas as formulações. O FPS da formulação O7%B3,5% está de acordo com os valores obtidos para FFP's comerciais contendo concentrações próximas destes dois filtros (DUTRA et al., 2004).

Quadro 3.5- Influência da dosagem no FPS-UVB.

FPS rótulo	Proteção UVB aproximada (%)	FPS/aplicação de filtro solar (mg/cm <sup>2</sup> )		
		2,0*	1,0	0,5
2,0	50,0	2,0	1,0	1,2
4,0	75,0	4,0	2,0	1,4
8,0	87,0	8,0	2,8	1,7
15,0	93,0	15,0	3,9	2,0
30,0	96,0	30,0	5,5	2,3

\*Quantidade adequada a ser aplicada na pele. Quadro e título obtidos de Nascimento et al. (2014).

A razão UVA/UVB da formulação E10% foi de 1,3 (Ultra atividade anti-UVA pelo Boot Star) (Tabela 3.6), em certa conformidade com o valor do extrato, que foi de 1,25 (Tabela 3.5). Dentre as FFP's sem extrato, a formulação O7% apresentou a menor Razão UVA/UVB (0,38), o mais próximo ao limite aceitável pela Anvisa, e na faixa de atividade anti-UVA classificada como Moderada do Boot Star. A adição do extrato aumentou essa razão para 0,47, dentro da faixa considerada Boa atividade anti-UVA e igual ao efeito da mistura com benzofenonona a 3,5% (0,48). A adição do extrato à formulação B3,5% aumentou a razão de



0,93 para 1,1 (Ultra anti-UVA). E, por fim, o extrato aumentou de 0,48 para 0,55 a razão da FFP O7%B3,5% Tabela 3.6.

Tabela 3.6- Fator de proteção solar (FPS) *in vitro* e Razão UVA/UVB de formulações fotoprotetoras (FFP) em base O/A.

FFP	O7%	O7% E10%	B3,5%	B3,5% E10%	B3,5% O7%	B3,5% O7% E10%	C.V. (%)
FPS	12,7±0,1 <sup>d</sup>	13,6±0,2 <sup>c</sup>	4,3±0,1 <sup>e</sup>	4,7±0,2 <sup>e</sup>	15,1±0,2 <sup>b</sup>	15,6±0,2 <sup>a</sup>	1,69
UVA/UVB	0,38±0,00 <sup>e</sup>	0,47±0,00 <sup>d</sup>	0,93±0,02 <sup>b</sup>	1,1±0,01 <sup>a</sup>	0,48±0,01 <sup>d</sup>	0,55±0,01 <sup>c</sup>	1,70

Médias seguidas pelas mesmas letras na linha não possuem diferença significativa, segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). O/A: oleosa/aquosa; C.V.: coeficiente de variação. O7%: metoxicinamato de octila a 7%; B3,5%: benzofenona a 3,5%; E10%: extrato metanólico de inflorescência de *L. origanoides* a 10%.

Considerando que o valor de FPS da formulação E10% foi de 1,3, pode-se observar que os aumentos dos FPS com a adição do extrato não correspondem a 1,3. Isto pode ser explicado pela torção no pico da curva de absorção de um composto quando o mesmo se encontra em mistura, principalmente, quando os compostos apresentam picos próximos uns dos outros ou sobrepostos. Este decréscimo também foi observado entre O7%, B3,5% e O7%B3,5%.

Os resultados apresentados acima indicam o potencial dos compostos presentes nos extratos metanólicos dos órgãos aéreos de *L. origanoides*, principalmente no da inflorescência, como ativos coadjuvantes em FFP's comerciais. Esse potencial é ainda maior por existirem estudos comprovando a sua ação antígeno-tóxica e anticarcinogênica contra a ação da radiação UV e ainda sua segurança como não tóxico e não clastogênico (FUENTES et al., 2017; GARCÍA-BORES et al., 2017).

A segurança e eficácia de filtros comerciais são foco de discussão. Algumas moléculas, como o PABA, o amil dimetil PABA e a benzofenona-10, foram proibidas por seus efeitos alergênicos, e à benzofenona-3 é atribuída a causa de fotoalergias de contato. Estudos também indicam a absorção sistêmica dos filtros sintéticos benzofenona-3 e metoxicinamato de octila, porém apenas quanto aplicadas concentrações acima da permitida pela Anvisa, de 10% para ambos. Nanopartículas de filtros inorgânicos, quando aplicadas topicamente podem penetrar através da pele e chegar ao sistema sanguíneo, podendo estimular a produção de radicais livres, se acumular no estrato córneo e causar danos à saúde (BALOGH et al., 2011). Assim, é grande a busca por compostos fotoprotetores naturais, com ausência de riscos à saúde, e até mesmo, com outros benefícios associados, como a atividade antioxidante.

A atividade fotoprotetora de compostos orgânicos está ligada a conformações estruturais que permitem a ressonância eletrônica, o que os mantém estáveis quando excitados pela absorção de energia solar. Por essa razão, fotoproteção está quase sempre associada à presença

de anéis aromáticos (FLOR et al. 2007). Neste contexto, os polifenóis, presentes nos extratos de *L. origanoides*, apresentam grande potencialidade como filtros fotoprotetores, pois possuem anéis aromáticos e grupos –OH substituintes, entre outras variações estruturais, que permitem a ressonância eletrônica e a absorção de radiação UVB e UVA. Em adição à capacidade de absorção de radiação UV deletéria, a elevada propriedade antioxidante destes compostos atua em outra frente da fotoproteção. A exposição excessiva ao Sol provoca a formação de radicais livres, danos ao material genético, peroxidação lipídica, envelhecimento precoce, supressão imunológica, eritema cutâneo e reação inflamatória. Os polifenóis combatem todos estes danos nos tecidos causados pelo estresse oxidativo proveniente da incidência de radiação UV na pele (BALOGH et al., 2011).

Os extratos metanólicos dos órgãos aéreos apresentaram atividade antioxidante e teor de fenólicos e de flavonoides consideráveis, mostrando que seu potencial se deve tanto à capacidade de absorção da radiação UVA e UVB, ou seja, bloqueio da ação danosa sobre o DNA e as demais moléculas das células da pele, quanto às propriedades antioxidantes, ou seja, corrigindo os danos oxidativos causados por esta radiação.

### 3.4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, infere-se que as suspensões de material celular de *A. niger* e *F. oxysporum* e solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são capazes de elicitar o metabolismo de defesa de plantas de *L. origanoides*.

Nas condições testadas, os elicitores não influenciam a produção de fenólicos e flavonoides totais e a atividade antioxidante nos extratos de folha e inflorescências. O uso de elicitores de *F. oxysporum* e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduz a produção de compostos fenólicos totais livres no caule e na raiz. A aplicação de elicitores de *F. oxysporum* aumenta a atividade antioxidante do extrato metanólico do caule, no entanto elicitores de *A. niger* e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduzem esta ação nos extratos de raiz. A atividade antioxidante mostrou-se inversamente proporcional ao teor de compostos fenólicos totais do extrato do caule e ao teor de flavonoides totais dos extratos de folha e raiz.

Os extratos metanólicos dos órgãos aéreos apresentam atividade fotoprotetora *in vitro* promissora. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elicita o aumento da atividade fotoprotetora dos extratos metanólicos da inflorescência e do caule. O extrato das inflorescências mostra-se como potencial fonte de ativos fotoprotetores com alta eficiência. A adição deste extrato a formulações fotoprotetoras contendo filtros UV sintéticos aumenta o fator de proteção solar e a razão UVA/UVB destas formulações.

Foram observadas tendências positivas principalmente com a aplicação de elicitores de *F. oxysporum* e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo necessários mais estudos que avaliem o efeito dose-dependente e a resposta de forma cinética da aplicação destes elicitores. Além disso, é importante realizar maior investigação fitoquímica destes extratos através de técnicas mais modernas para se ter uma visão mais geral da resposta metabólica da planta.

Os resultados apresentados no atual trabalho são úteis para embasar novas pesquisas relativas à espécie, principalmente por ser o primeiro a avaliar o efeito de elicitores de fungos e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre a produtividade e a atividade de metabólitos secundários, e a determinar o fator de proteção solar para extratos e de formulações fotoprotetoras da *L. origanoides*.

## REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, I. C. A. et al. Prolina livre em alecrim-pimenta sob estresse hídrico antes da colheita. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v. 13, p. 539-541, 2011.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.
- BALOGH, T. S. et al. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 732-742, 2011.
- BANOV, D. et al. Caracterização do extrato seco de *Ginkgo biloba* L. em formulações de uso tópico. **Acta farmacêutica bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 219, 2006.
- BOLIGON, A. A.; MACHADO, M. M.; ATHAYDE, M. L. Technical evaluation of antioxidant activity. **Medicinal Chemistry**, 4, n. 7, p. 517-522, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC Nº 30 de 1º de junho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 21 de ago. 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução R.E. n.47, de 16 de agosto de 2006. **Lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes**. Brasil: Anvisa. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=21264&word=Filtros%20ultravioletas>. Acesso em: 10 abril 2017
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **RENISUS – Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS**. v. 24. Brasília – DF. 2009. Disponível em: <portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2017.
- BRASIL. Ministério de Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: Anvisa, 2011. 126p.
- CÁCERES, A., J. Assessment of antioxidant activity of 24 native plants used in Guatemala for their potential application in natural product industry. In: International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants IMAPS 2010 and History of Mayan Ethnopharmacology IMAPS 2011 964. **Anais...** Antigua: Acta Horticulturae. v. 964. 2012. p. 85-92.
- CAMPOS, Â. D. et al. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.
- CASTRO, R. A.; ALBIERO, A. L. M. O mercado de matérias primas para indústria de fitoterápicos. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 10, n. 1, p. 59-72, 2016.
- COELHO, A. G. et al. Optimization and standardization of extraction method from *Lippia origanoides* HBK: Focus on potential anti-hypertensive applications. **Industrial Crops and Products**, v. 78, p. 124-130, 2015.
- CONCEIÇÃO, L. F. et al. Induction of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. cells by *Colletotrichum gloeosporioides* elicitation. **Phytochemistry**, v. 67, n. 2, p. 149-155, 2006.
- DAAYF, F. et al. Elicitation of soluble phenolics in date palm (*Phoenix dactylifera*) callus by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* culture medium. **Environmental and Experimental Botany**, v. 49, n. 1, p. 41-47, 2003.
- DOREY, S. et al. Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanine ammonia-lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitor. **Plant Physiology**, v. 121, n. 1, p. 163-172, 1999.
- DUTRA, E. A. et al. Determination of sun protection factor (SPF) of sun screens by ultraviolet spectrophotometry. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 381-385, 2004.
- FABRI, R. L. et al. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds of *Lippia* species by bioautography. **Journal of medicinal food**, v. 14, n. 7-8, p. 840-846, 2011.
- FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores solares. **Química Nova**, p. 153-158, 2007.

- FUENTES, J. L. et al. The SOS Chromotest applied for screening plant antigenotoxic agents against ultraviolet radiation. **Photochemical & Photobiological Sciences**, p. 1-5, 2017.
- GADZOVSKA, S. M. S. et al. Jasmonic acid elicitation of *Hypericum perforatum* L. cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphthodianthrone. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 89, n. 1, p. 1-13, 2007.
- GARCÍA-BORES, A. M. et al. *Lippia graveolens* photochemopreventive effect against UVB radiation-induced skin carcinogenesis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 167, p. 72-81, 2017.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.
- GORELICK, J.; BERNSTEIN, N. Elicitation: an underutilized tool for the development of medicinal plants as a source for therapeutic secondary metabolites. In: SPARKS, D. L. **Advances in Agronomy**. v. 124. Londres: Academic Press, 2014, p. 201-230.
- GUARATINI, T. et al. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 717-721, 2009.
- INSTITUTO DE FÍSICA. Universidade Federal do Rio grande do Sul. **O espectro eletromagnético**. Disponível em: <http://www.if.ufrgs.br/tex/fis01043/20022/Carla/espectro.htm>. Acesso em: 22/08/2017
- KLEIN, T. et al. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.
- LEÓN, J.; LAWTON, M. A.; RASKIN, I. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology**, v. 108, n. 4, p. 1673-1678, 1995.
- LIM, F. L. et al. Elicitation of *Orthosiphon stamineus* cell suspension culture for enhancement of phenolic compounds biosynthesis and antioxidant activity. **Industrial crops and products**, v. 50, p. 436-442, 2013.
- MANSUR, J. D. S. et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 61, n. 3, p. 121-4, 1986.
- MARTÍNEZ-ROCHA, A. et al. Antioxidant and antimutagenic activities of Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth). **Plant foods for human nutrition**, v. 63, n. 1, p. 1-5, 2008.
- MORAIS, S. M. et al. Atividade sequestradora de radical livre, teor de compostos fenólicos e inibição da acetilcolinesterase de extratos de plantas medicinais das Farmácias Vivas. In: 48º Congresso Brasileiro de Química. **Anais eletrônicos...** Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Química. 2008. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2008/trabalhos/7/7-445-4813.htm>. Acesso em: 09 nov. 2016.
- MORAIS, S. M. et al. Correlação entre as atividades antirradical, antiacetilcolinesterase e teor de fenóis totais de extratos de plantas medicinais de farmácias vivas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 4, p. 575-582, 2013.
- NASCIMENTO, L. F. do; SANTOS, E. P. dos; AGUIAR, A. P. de. Fotoprotetores orgânicos: Pesquisa, inovação e a importância da síntese orgânica. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 2, p. 190-223, 2014.
- OLIVEIRA JUNIOR, R. G. de et al. *In vitro* antioxidant and photoprotective activities of dried extracts from *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 1, p. 122, 2013.
- OLIVEIRA, M. B. de; ABREU, H. dos S.; PEREIRA, R. P. W. Teor de lignina em plantas de *Eucalyptus urophylla* ST Blake tratadas com fitorreguladores. **Silva Lusitana**, v. 17, n. 1, p. 51-57, 2009.
- PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.
- PERES, M. T. et al. Chemical and biological studies of *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel (Polypodiaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 897-901, 2009.
- RESENDE, M. L. V. et al. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo**, v. 15, p. 173-242, 2006.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical biology and medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.
- RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in plant science**, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

- ROCHA, A. V. **Probabilidade e Estatística**, editor: Eduardo de Santana Medeiros Alexandre. João Pessoa: Editora da UFPB, 2014.
- RODRIGUES, W. Competitividade e mudança institucional na cadeia produtiva de plantas medicinais no Brasil. **Interações**, Campo Grande, v. 17, n. 2, 2016.
- SAYRE, R. M. et al. A comparison of in vivo and *in vitro* testing of sun screening formulas. **Photochemistry and Photobiology**, v. 29, n. 3, p. 559-566, 1979.
- SILVA, G. C. **Biorreguladores vegetais, substratos e estaquia em *Lippia organoides* Kunth (Verbenaceae)**. 2012. 1v. 82f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – UEFS, Feira de Santana, Bahia.
- SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- SOUZA, L. M. **Flavonoides totais, atividade antioxidante e variação sazonal da composição química do óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia organoides* Kunth.)**. 2015. 1v. 116f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – UFMG, Montes Claros, Minas Gerais.
- ŚWIECA, M. Production of ready-to-eat lentil sprouts withim proved antioxidant capacity: optimization of elicitation conditions with hydrogen peroxide. **Food Chemistry**, v. 180, p. 219-226, 2015.
- TEIXEIRA, T. S.; GUIMARÃES, L. G. L. Atividade antioxidante de extratos etanólicos de espécies vegetais do tocantins. In: 9º Seminário de Iniciação Científica da UFT. **Anais eletrônicos...** Palmas: UFT, 2013. Disponível em: <http://eventos.uft.edu.br/index.php/sic/IX/paper/viewFile/420/25>. Acesso em: 20 jul. 2017.
- VALLE, T. et al. Antifungal activity of scopoletin and its differential accumulation in *Ulmus pumila* and *Ulmus campestris* cell suspension cultures infected with *Ophiostoma ulmispores*. **Plant Science**, v. 125, n. 1, p. 97-101, 1997.
- VANNUCCHI, H. et al. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina** (Online), Ribeirão Preto, v. 31, n. 1, p. 31-44, 1998.
- VASCONSUELO, A.; BOLAND, R. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. **Plant Science**, v. 172, n. 5, p. 861-875, 2007.
- VELASCO, M. V. R. et al. Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (*in vitro*) - revisão. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 27-34, 2011.
- ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 283-333, 2005.

## CONCLUSÕES GERAIS

No presente trabalho, foi investigada a possibilidade de se interferir na produção de metabólitos secundários de plantas cultivadas de *Lippia origanoides* Kunth. A intenção foi aumentar a síntese de compostos responsáveis por propriedades biológicas atribuídas à espécie. Por isso, em paralelo às análises fitoquímicas, buscou-se realizar ensaios biológicos *in vitro* que pudessem indicar alterações no conteúdo dos compostos ativos das plantas, alterações estas relacionadas aos tratamentos em teste. Além disso, buscou-se investigar a influência sobre o metabolismo secundário por dois diferentes meios, a análise dos compostos voláteis hidrodestilados e dos extratos metanólicos brutos.

Nas condições testadas, a produção de óleo essencial de folhas não é alterada pelos elicitores bióticos (material celular de *Aspergillus giner* ou *Fusarium oxysporum*) e pelo elicitor abiótico (peróxido de hidrogênio exógeno) avaliados, da mesma forma que a composição do óleo essencial das folhas. Nas inflorescências, o peróxido de hidrogênio promove aumento da produção de óleo essencial, e o material celular de *F. oxiporum* aumenta o conteúdo relativo de biciclogermacreno deste óleo essencial. Ambos os óleos essenciais apresentam atividade antimicrobiana, contra as bactérias gram-positiva, gram-negativa e a levedura resistentes testadas. Todos os elicitores tendem a aumentar as atividades inibidora e/ou microbicida frente *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, e a reduzir estas atividades contra *Escherichia coli*, dos dois óleos essenciais.

A partir destes resultados, infere-se que todos os elicitores são efetivos em alterar o conteúdo de terpenoides voláteis com elevada ação antimicrobiana contra a bactéria gram-positiva e a levedura utilizadas nestes testes. Possivelmente, vários compostos agem em conjunto para a determinação desta atividade, e alterações sutis em suas concentrações têm consequências na efetividade do óleo essencial. Sugere-se, ainda, que os compostos ativos contra *E. coli* são diferentes daqueles com ação sobre os outros micro-organismos testados.

Os extratos metanólicos de folhas e inflorescências não são influenciados pelos elicitores quanto ao teor de compostos fenólicos e flavonoides totais e à atividade de sequestro de radicais livres. Estes extratos, assim como o extrato de caule, apresentam boa atividade antioxidante e quantidade de compostos fenólicos. O material celular de *F. oxysporum* reduz os teores de compostos fenólicos e flavonoides dos extratos metanólicos do caule e da raiz. O peróxido de hidrogênio também reduz o teor de fenólicos no extrato do caule. A atividade antioxidante do extrato do caule é aumentada com a aplicação de material celular de *F. oxysporum*. Do extrato da raiz, essa atividade é reduzida com peróxido de hidrogênio e com

material celular de *A. niger*. O teor de compostos fenólicos no extrato do caule e o teor de flavonoides nos extratos de folhas e raiz é inversamente proporcional à atividade antioxidante.

Os efeitos dos elicitores sobre a produção de metabólitos secundários de *L. origanoides* são diferentes a depender das classes de compostos analisadas. Isto indica que a resposta de defesa desta espécie é complexa e deve ser investigada mais profundamente.

Os extratos metanólicos de inflorescência apresentam boa ação fotoprotetora, com fator de proteção solar e razão UVA/UVB consideráveis. O peróxido de hidrogênio aumenta o fator dos extratos de caule e inflorescências, e o material celular de *A. niger* aumenta o fator de extrato do caule. O extrato de inflorescências tratadas com peróxido de hidrogênio eleva o fator de proteção solar e a razão UVA/UVB de formulações fotoprotetoras contendo ativos sintéticos. Assim, entende-se que o extrato metanólico de inflorescências de *L. origanoides* é um potencial adjuvante em protetores solares, e a aplicação de peróxido de hidrogênio nas plantas aumenta o acúmulo de compostos fotoprotetores neste extrato.

Por fim, conclui-se que a produção de compostos ativos de plantas cultivadas de *L. origanoides* pode ser estimulada pelos elicitores estudados, principalmente com o uso de peróxido de hidrogênio e material celular de *Fusarium oxysporum*. Entretanto, testes adicionais devem ser realizados a fim de avaliar a resposta da planta a diferentes doses e épocas de colheita, visando a otimização da técnica. Aponta-se, ainda, a importância da avaliação do perfil fitoquímico dos extratos por técnicas cromatográficas apuradas, para se obter uma visão global da elicitação sobre a produção de metabólitos secundários.

Considerando o baixo custo, a facilidade de aquisição e manipulação e os resultados obtidos no presente trabalho, enfatiza-se o potencial do peróxido de hidrogênio como elicitor de plantas medicinais, como *L. origanoides*.



APÊNDICE 1 - Faixa de concentrações inibitória mínima (CIM), bactericida mínima (CBM) e fungicida mínima (CFM) dos óleos essenciais de *L. origanoides* ( $\mu\text{L/mL}$ ) sob elicitação, frente a diferentes microrganismos.

Tratamento	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Candida albicans</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CFM
	Folhas					
AN	1,19	2,38	0,30	0,59-1,19	0,16-0,30	0,59
FO	2,38	2,38-4,75	0,30	0,59-1,19	0,30	0,59
SH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,19-2,38*	2,38-4,75	0,30	0,59-1,19	0,30	0,59
CT	1,19	1,19-2,38	0,30	1,19	0,16-0,30	1,19
	Inflorescências					
AN	1,19-2,38	2,38-4,75	0,30-0,59	1,19-2,38	0,30	1,19
FO	2,38	2,38-4,75	0,30-0,59	0,59-1,19	0,30**	1,19**
SH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,19-2,38	2,38	0,30-0,59	0,59-1,19	0,30	2,38
CT	1,19-2,38	2,38	1,19	1,19	0,16-0,30	2,38
Cloranfenicol ( $\mu\text{g/mL}$ )	300	>300	4,69-9,37	>300	-	-
Nistatina ( $\mu\text{g/mL}$ )	-	-	-	-	1,56	3,12-6,25

\*Variação da concentração entre as repetições. \*\*Valor correspondente a uma repetição. AN: *Aspergillus niger*; FO: *Fusarium oxysporum*; SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; CT: controle (água destilada).

APÊNDICE 2 - Porcentagem de Sequestro de Radical Livre DPPH• (%SRL) média de extratos metanólicos de *L. origanoides* sob elicitação. AN: *Aspergillus niger*; FO: *Fusarium oxysporum*; SH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; CT: controle (água destilada). R<sup>2</sup>: coeficiente de explicação dos dados.

