

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ÔRGÂNICA

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADES ANTIINFLAMATÓRIA,
TRIPANOMICIDA E ANTINEOPLÁSICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
tetradenia riparia HOCHSTETTER CODD.

HELENA DE SOUZA TORQUILHO





**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADES BIOLÓGICA,
TRIPANOMICIDA E ANTINEOPLÁSICA DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *TETRADENIA RIPARIA* HOCHSTETTER CODD.**

HELENA DE SOUZA TORQUILHO

Sob a Orientação do Professor

D. Sc. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy

Tese submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de **Doutor** em
ciências. Área de concentração em
Química Orgânica.

Seropédica, RJ
Fevereiro, 2001

FICHA CATALOGRÁFICA

TORQUILHO, Helena de Souza

Composição Química, Atividade Biológica, Tripanomicida e Neoplásica do Óleo Essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. Rio de Janeiro, 2001.

134 páginas

Tese (Doutorado) – Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, 2001

1. Óleo Essencial 2. Atividade Biológica 3. *Lamiaceae*
I. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química
II. Título

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA, TRIPANOMICIDA E
ANTINEOPLÁSICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *TETRADENIA RIPARIA*
HOCHSTETTER CODD.

HELENA DE SOUZA TORQUILHO

APROVADA EM 12 / 02 / 2001

Dr. RONOEL LUIZ DE OLIVEIRA GODOY Ronoel Luiz de O. Godoy
(EMBRAPA – AGROINDÚSTRIA DE ALIMENTOS – UFRRJ)

Dr. CARLOS ALBERTO DA SILVA RIEHL Carlos Riehl
(DEPTº DE QUÍMICA ANALÍTICA – IQ – UFRRJ)

Dr. ANSELMO ALPANDE MORAIS Anselmo Alpande Moraes
(DQ – ICE – UFRRJ)

Dra. ROSANE NORA CASTRO Rosane Nora Castro
(DQ – ICE – UFRRJ)

Dra. IZABELA MIRANDA DE CASTRO Izabela Miranda de Castro
(EMBRAPA – AGROINDÚSTRIA DE ALIMENTOS – RJ)

Dra. ALAÍDE DE SÁ BARRETO Alaide de Sá Barreto
(FIOCRUZ, Suplente)

Dra. HELOISA DE MELLO Helouisa de Mello
(FARMANGUINHOS – FIOCRUZ, Suplente)

Este trabalho foi realizado sob a orientação do professor D. Sc. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

Aos meus pais Itacy (postumo) e Arlete, meus exemplos de coragem e luta.

Aos meus irmãos Ricardo, Marília e Renato pelo carinho e estímulo.

Especialmente ao meu marido José Carlos, e aos meus filhos Pedro, André e Luíza pela compreensão ajuda e principalmente, pelo amor dedicado.

A família Godoy pela amizade, que tanto me encorajou para o término deste trabalho.

Quando o sofrimento vier ao teu encontro, deixe dos olhos rolar uma lágrima, dos lábios um sorriso e do coração uma prece, pois só assim serás feliz e entenderás que, o que para a lagarta é o fim, para a borboleta é apenas o começo.

Desconhecido

Agradecimentos

Quando começamos um trabalho não imaginamos que tantas coisas possam acontecer e nos derrubar, é necessário um “anjo amigo” que esteja nos incentivando sempre, que nos dê uma bronca e ao mesmo tempo nos oriente e ampare, este “anjo amigo” foi o **meu orientador D. Sc. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy** que me ajudou a enfrentar todas as etapas para o término deste trabalho, e que, sem dúvida nenhuma é meu amigo. Costumo dizer que Deus me levou um pai e me deu um irmão. Estou emocionada apenas por escrever estas linhas, mais gostaria de poder expressar o quanto sua orientação, não só científica como também de vida, foi importante nesta fase difícil da minha vida. Muito obrigada!

Quero agradecer a família Godoy (Solange, Raquel e Bruno) que no decorrer deste trabalho, adotaram minha família.

Meus sinceros agradecimentos aos Professores da pós-graduação do departamento de química orgânica da UFRRJ, pela colaboração e, principalmente pela compreensão.

Agradeço a Dra. Elsie Franklin Guimarães pela dedicação e conhecimentos botânicos sem os quais este trabalho seria impossível.

A Embrapa Agroindústria de Alimentos pela oportunidade de realizar este trabalho, assim como a todos os pesquisadores e técnicos do laboratório de óleo essencial: Regina, Daise, Mário, David, Rosimar, Delma e Fabiana.

A todo o pessoal do laboratório de engenharia química IPE - CETEX, pela atenção, colaboração e na utilização do espectrometro de massas

A Dra Leonor Laura Leon do Departamento de imunologia, FIOCRUZ

A Mariana, Elaine e Dra Maria da Graça M. O. Henriques do Laboratório de Química de Produtos Naturais e Farmacologia de Far-Manguinhos, FIOCRUZ

Aos meus amigos Ana Maria Pereira da Silva, José Américo, e D. Joaquina .

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE QUADROS	
ÍNDICE DE TABELAS	
ÍNDICE DE CROMATOGRAMAS	
ÍNDICE DE ESPECTROS	
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVO	4
CAPÍTULO 1- Composição Química do Óleo Essencial de <i>Tetradenia riparia</i> Hochstetter Codd.	
INTRODUÇÃO	6
RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
EXPERIMENTAL	74
CAPÍTULO 2 - Atividades Antiinflamatória, tripanomicida e antineoplásica do Óleo Essencial de <i>Tetradenia riparia</i> Hochstetter Codd.	
INTRODUÇÃO	77
RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
EXPERIMENTAL	99
CONCLUSÃO	103
ANEXOS	105
BIBLIOGRAFIA	

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas e Técnicas
AMDIS	“Automated Mass Deconvolution and Identification System”
CGAR	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução.
CGAR-DSM	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução-Detector Seletivo de Massas
CIT	Cromatograma de Íons Totais
EPA	Agência de Proteção Animal
E.M.	Espectro de Massas
IRR	Índice de Retenção Relativo
Lit	Literatura.
LPS	Lipopolissacarídeo
<i>m/z</i>	massa/carga
MEFS	Micro-Extração em Fase Sólida
NIST	“National Institute of Standards and Technology”.
OPAQ	Organização para a Proibição de Armas Química
PBM	“Probability Based Matching”
PBS	Phosphate Buffer Solution”
p.	página

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura -1:** Desenho de uma seringa usada para a técnica de micro-extração em fase sólida e injeção manual. 8
- Figura -2:** Manuseio do sistema da seringa de MEFS no processo de extração e o de dessorção no injetor do Cromatógrafo Gasoso (CG). 9
- Figura -3:** Ilustração dos quatro passos para determinar se o pico cromatográfico deve ser percebido por um componente. 14
- Figura -4:** Centralização e interpolação de assimetria de picos cromatográficos para detecção de componentes. 14
- Figura -5:** Foto da exsicata de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd, depositada no herbário de Jardim Botânico do Rio de Janeiro RB-331320. 19
- Figura -6:** Resultado da comparação automática fornecida pela espectroteca “NIST”. Onde (**A**) é o espectro de massas obtido; (**B**) é a diferença entre o espectro de massas obtido e o da espectroteca “NIST” e o (**C**) é o espectro de massas da espectroteca “NIST”. 48
- Figura -7:** Resultado da comparação automática do elemol fornecida pela espectroteca “NIST”. (**A**) Espectro de massas do elemol da espectroteca “NIST”; (**B**) Demonstração da diferença entre os espectros e o (**C**) Espectro de massas do pico no tempo de retenção 41.335 minutos (elemol). 58
- Figura -8:** Resultado da comparação automática do espectro de massas deconvoluído do globulol (t_R 43,920 min.) com a espectroteca “NIST”.(**A**) Espectro de massas do globulol da espectroteca “NIST”; (**B**) Demonstração da diferença entre os espectros e o (**C**) Espectro de massas do pico no tempo de retenção 43,920 minutos (globulol g). 62
- Figura -9:** Resultado da comparação automática do espectro de massas deconvoluído do espatulenol fornecido pela espectroteca “NIST”. (**A**) Espectro de massas do espatulenol da espectroteca “NIST”; (**B**) Demonstração da diferença entre os espectros e o (**C**) Espectro de massas do pico no tempo de retenção 43,506 minutos (espatulenol). 64
- Figura -10:** Resultado da comparação do espectro de massas deconvoluído do tempo de retenção 50,784 minutos com a espectroteca “NIST”. (**A**) Espectro de massas do shiobunol da espectroteca “NIST”; (**B**) Demonstração da diferença entre s espectros e o (**C**) Espectro de massas do pico no tempo de retenção 50,784 minutos. 66

- Figura-11:** Resultado da comparação automática do espectro de massas deconvoluído do filocladeno com a espectroteca “NIST”. (**A**) Espectro de massas do filocladeno da espectroteca “NIST”; (**B**) Demonstração da diferença entre os espectros e o (**C**) Espectro de massas do pico no tempo de retenção 50.393 minutos (filocladeno 7). 67
- Figura-12:** Resultado da comparação automática do espectro de massas deconvoluído do oxido de manoila com a espectroteca “NIST”. (**A**) Espectro de massas do óxido de manoila da espectroteca “NIST”; (**B**) Demonstração da diferença entre os espectros e o (**C**) Espectro de massas do pico no tempo de retenção 46.814 minutos (óxido de manoíla 8). 68
- Figura-13:** Resultado da comparação do espectro de massas deconvoluído do abietatrieno com a espectroteca “NIST”. (**A**) Espectro de massas do abietatrieno da espectroteca “NIST”; (**B**) Demonstração da diferença entre os espectros, (**C**) Espectro de massas do pico no tempo de retenção 48.827 minutos (abietrieno 9). 69
- Figura-14:** Reação inflamatória, fenômeno estereotipado cujos sinais são rubor, tumor, calor e dolor. As alterações vasculares (vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo seguido por estase, aumento de permeabilidade vascular) iniciam-se imediatamente e desenvolvem-se durante as primeiras horas após o estímulo inflamatório. 78
- Figura-15:** Processo de indução de pleurisia em camundongos, que permite a avaliação diversos parâmetros, como: extravasamento protéico, migração de leucócitos e envolvimento de mediadores químicos. 80
- Figura-16:** Avaliação citotóxica, sobre hemácias, do óleo essencial de mirra. 90
- Figura-17:** Efeito do pré-tratamento com o óleo essencial de mirra sobre o acúmulo de Azul de Evans induzido por carragenina em camundongos. O óleo essencial foi administrado por via oral 1 hora antes da injeção intratorácica de carragenina sendo o acúmulo de Azul de Evans (25mg/Kg) avaliado, 4h. após o estímulo, por espectrofotometro a 600 nm. O resultado foi de que o óleo essencial de mirra não apresentou efeito inibitório demonstrado pelo Azul de Evans. 90

- Figura -18:** Efeito do pré-tratamento com o óleo essencial de mirra (100mg/Kg) na pleurisia induzida por carragenina (300µg/cavidade). O óleo foi administrado por via oral 1 hora antes da injeção intratorácica de carragenina, sendo o acúmulo celular avaliado 24 horas após o estímulo. O resultado foi de que o óleo essencial de mirra não apresentou efeito inibitório na pleurisia induzida por carragenina. 91
- Figura -19:** Efeito do pré-tratamento do óleo essencial de mirra administrado oralmente na dose de 100mg/Kg, na pleurisia induzida por LPS (250ng/cavidade). O óleo foi administrado por via oral 1 hora antes da injeção intratorácica de LPS, sendo o acúmulo celular avaliado 24 horas após o estímulo. O resultado foi de que o óleo essencial de mirra não apresentou efeito inibitório na pleurisia induzida por LPS. (1a) Total de Leucócitos, (1b) Células mononucleares, (1c) Neutrófilos (1d) Eosinófilos. 92
- Figura -20:** Efeito do pré-tratamento com óleo essencial de mirra sobre em edema de pata induzido por injeção sub-planar de carragenina (300µg/pata) na pata esquerda de camundongos. O óleo foi administrado por via oral 1 hora antes da injeção do estímulo, o aumento de volume foi avaliado 4 h. após o estímulo. O resultado foi de que o óleo essencial de mirra apresentou atividade antiinflamatória para edema de pata. 93
- Figura -21:** Efeito do óleo essencial de mirra sobre a produção de óxido nítrico, após injeção intraperitoneal de tioglicolato 3%, em células da cavidade peritoneal de camundongos estimulada com LPS (30ng/mL) nas concentrações de 1µg/poço e 10 µg/poço do óleo. O resultado foi de que o óleo essencial de mirra apresentou atividade inibitória na produção de óxido nítrico. 94
- Figura - 22:** Gráfico e equação para determinação da dose letal (que inibe 50% do crescimento celular) do óleo essencial de mirra. 97

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro-1: Proposta de fragmentação do shiobunol	29
Quadro-2: Proposta de fragmentação do elemol	59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela-1: Índices físico químicos do óleo de <i>Tetradenia riparia</i> Hochstetter Codd.	20
Tabela-2: Divisão do cromatograma e do CIT do óleo essencial de mirra, (obtido por coação). Condições de análise: coluna polar (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, FID 280°C, gás de arraste hidrogênio, fluxo da coluna 1mL / min “split” de 1:100), dividido em 4 regiões.	21
Tabela-3: Substâncias identificadas na 3ª região do cromatograma do óleo essencial de mirra, (obtido por coação). Condições de análise: coluna polar (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, temperatura do injetor de 250°C, FID 280°C, gás de arraste hidrogênio, fluxo da coluna de 1mL / min e “split” de 1:100).	26
Tabela-4: Tempos de retenção de alguns dos picos encontrados na quarta região do cromatograma do óleo essencial de mirra, (obtido por coação). Condições de análise: coluna polar (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, temperatura do injetor de 250°C, FID 280°C, gás de arraste hidrogênio, fluxo da coluna de 1mL / min e “split” de 1:100).	30
Tabela-5: Análise comparativa da técnica de micro-extração em fase sólida e a técnica de extração por coação.	44
Tabela-6: Resultado da identificação automática de alguns constituintes do óleo essencial de mirra, obtidos por MEFS.	60
Tabela-7: Identificação dos constituintes do óleo essencial de <i>Tetradenia riparia</i> Hochstetter Codd. em coluna de fase apolar (5% difenil e 95% dimetil polisiloxano).	71
Tabela-8: Contagem das células no “screening” do óleo essencial de mirra, para o cálculo do seu efeito citotóxico.	94
Tabela-9: Resultado da avaliação da atividade antineoplásica do óleo de mirra nas 7 linhagens tumorais estudadas.	95
Tabela-10: Dados experimentais do ensaio “in vitro” da atividade anti- <i>Leishmania amazonensis</i> (promastigotas) do óleo essencial de mirra, para obtenção da dose letal (DL ₅₀).	97

ÍNDICE DE CROMATOGRAMAS

- Cromatograma-1:** CGAR do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd, (obtido por coobação) e as marcações dos lugares onde eluiram os padrões de *n*-alcanos de C₇ a C₂₇. Condições de análise: coluna polar (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, FID 280°C, gás de arraste hidrogênio, fluxo da coluna 1mL / min “split” de 1:100). 22
- Cromatograma-2:** CIT do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd.(obtido por coobação). Condições de análise: coluna polar (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min “split” de 1:100). 22
- Cromatograma-3:** CGAR da 1ª região (t_R 2,218 a 17,095 min.) do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (obtido por coobação), com os padrões C₇ a C₁₄ marcados. Condições de análise: coluna polar (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, FID 280°C, gás de arraste hidrogênio, fluxo da coluna 1mL / min “split” de 1:100). 23
- Cromatograma-4:** Expansão da 1ª região do CIT do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min., “split” de 1:100), e o espectro de massas da fenchona, leitura de varredura 1898. 24
- Cromatograma-5:** CGAR da 2ª região (t_R 17,332 e 49,539 min.) do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd, (obtido por coobação), com os padrões C₁₅ a C₁₉ marcados. Condições de análise: coluna polar (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, , FID 280°C, gás de arraste hidrogênio, fluxo da coluna 1mL / min., “split” de 1:100). 25

- Cromatograma-6:** CGAR da 3ª região (t_R 39,539 e 69,063 min.) do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd, (obtido por coobação) com os padrões C₁₉ a C₂₄ marcados. Condições de análise: coluna polar (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, FID 280°C, gás de arraste hidrogênio, fluxo da coluna 1mL / min., “split” de 1:100). 27
- Cromatograma-7:** Expansão da 3ª região do CIT do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Cood. (obtido por coobação). Condições de análise: coluna polar (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1ml / min., “split” de 1:100) e o espectro de massas do shiobunol leitura de varredura 4586. 27
- Cromatograma-8:** CGAR da 4ª região (t_R 70,431 e 90,356 min.) do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd.(obtido por coobação) com os padrões C₂₄ a C₂₇ marcados. Condições de análise: coluna polar (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, FID 280°C, gás de arraste hidrogênio, fluxo da coluna 1ml / min., “split” de 1:100). 30
- Cromatograma-9:** CIT expandido da 4ª e última região do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd.(obtido por coobação). Condições de análise: coluna polar (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1ml / min., “split” de 1:100) e o espectro de massas do abiedieno leitura de varredura 5790. 31
- Cromatograma-10:** CGAR do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (obtido por coobação). Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, FID 280°C, gás de arraste hidrogênio, fluxo da coluna 1mL / min., “split” de 1:100). 37

- Cromatograma-11:** CIT do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (obtido por cooção). Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100). 37
- Cromatograma-12:** CGAR do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (obtido por cooção), com os padrões C₇ a C₁₂ co-injetados. Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, FID 280°C, gás de arraste hidrogênio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100). 38
- Cromatograma-13:** CGAR do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (obtido por cooção), com os padrões C₁₃ a C₁₇ co-injetados. Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, FID 280°C, gás de arraste hidrogênio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100). 39
- Cromatograma-14:** CIT do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (obtido por cooção). Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100) e o espectro de massas do pico com t_R 50,47 min. leitura de varredura 4603. 40
- Cromatograma-15:** CIT expandido do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, DSM 300°C, hélio, 1mL / min, “split” de 1:100) e o espectro de massas do pico com t_R 50,49 min., leitura de varredura 4606. 41

- Cromatograma-16:** Continuação do cromatograma do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (obtido por coobação), com os padrões C₁₈ a C₂₃ co-injetado. Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μm, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, FID 280°C, gás de arraste hidrogênio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100). 42
- Cromatograma-17:** CIT do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (extraído por MEFS com aquecimento), injeção manual em CGAR-DSM. Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μm, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100). 45
- Cromatograma-18:** CIT do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd., (extraído por MEFS sem aquecimento). Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μm, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100). 46
- Cromatograma-19:** CIT expandido do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (extraído por MEFS sem aquecimento). Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μm, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100), e o espectro de massas do *p*-menta-2,4(8)-dieno. 47
- Cromatograma-20:** CIT expandido (t_R 0,02 a 22,00 minutos) do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (obtido por coobação). Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μm, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100). 52

- Cromatograma-21:** CIT expandido do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (1ª janela), (obtido por cooção). Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100), Intensidade dos íons (2ª janela) e o espectro de massas deconvoluido do (t_R 9,01 min.) limoneno (3ª janela). 53
- Cromatograma-22:** CIT expandido do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (obtido por cooção). Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100) e o espectro de massas do tempo de retenção (t_R 41.29 min). 56
- Cromatograma-23:** CIT expandido do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (1ª Janela), (obtido por cooção). Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100), intensidade dos íons (2ª janela) e o espectro de massas deconvoluido do t_R 41,335 minutos (3ª janela). 57
- Cromatograma-24:** CIT expandido do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (1ª janela), (obtido por cooção). Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100), intensidade dos íons (2ª janela) e o espectro de massas deconvoluido do (t_R 43,920 min.) globulol 6 (3ª janela). 61

- Cromatograma-25:** CIT expandido do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (1^a Janela), (obtido por cooção). Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100), intensidade dos íons (2^a janela) e o espectro de massas deconvoluído do (t_R 43,506 min.) espatulenol (3^a janela). 63
- Cromatograma-26:** CIT expandido do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (1^a Janela), extraído por cooção (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100), intensidade dos íons (2^a janela) e o espectro de massas deconvoluído do t_R 50,784 min. (3^a janela). 65
- Cromatograma-27:** CIT do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (obtido por MEFS com aquecimento). Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100). Em destaque, expansão do CIT entre os t_R 45,54 e 56,38 minutos (óxido de manoila, filocladeno e abietatrieno). 70

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro-1: E.M. da fenchona, obtido na espectroteca “NIST”.	24
Espectro-2: E.M. do Shiobunol, obtido na espectroteca “NIST”.	28
Espectro-3: E.M. do abietadieno obtido na literatura (Adams, 1995).	31
Espectro-4: E.M. do abietatrieno, obtido do óleo essencial de <i>Tetradenia riparia</i> Hochstetter Codd. (obtido por coabação). Condições de análise: coluna polar (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, FID 280°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min., “split” de 1:100), e a leitura de varredura 6867.	32
Espectro-5: E.M. do Abietatrieno, obtido na espectroteca “NIST”.	32
Espectro-6: E.M. do t_R 90,356min., obtido do óleo essencial de <i>Tetradenia riparia</i> Hochstetter Cood. (obtido por coabação). Condições de análise: coluna polar (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, FID 280°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min., “split” de 1:100) e a leitura de varredura 7637.	33
Espectro-7: E.M. do <i>p</i> -menta-2,4(8)-dieno, obtido na espectroteca “NIST”.	48
Espectro-8: E.M. do limoneno, obtido na espectroteca “NIST”.	52
Espectro-9: E.M. deconvoluído do <i>p</i> -cimeno (t_R 8,765 min.), íons $m/z = 119$ e $m/z = 134$ constituinte do óleo essencial de <i>Tetradenia riparia</i> Hochstetter Codd. obtido após a deconvolução do pico do limoneno ($t_R = 9,01$ min.).	54
Espectro-10: E.M do <i>p</i> -cimeno, obtido na espectroteca “NIST”.	54
Espectro-11: E.M. do elemol, obtido na espectroteca “NIST”.	57

RESUMO

Técnicas de extrações convencionais necessitam de grandes quantidades de material e longos períodos de extração e aquecimento. A Micro-extração em fase sólida (MEFS) apresenta muitas vantagens em relação a estas técnicas já que é um método mais suave que não gera artefatos, requer pequenas quantidades de amostras, além de ser mais rápida e econômica.

No estudo da composição química da fração volátil do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (mirra), identificamos 115 constituintes (aldeído, epóxido, acetatos, monoterpenos, sesquiterpenos, e diterpenos), sendo: 66 pela técnica de extração por coobação, 5 pela técnica de MEFS e 44 com o sistema automático de deconvolução e identificação de espectros.

Esse estudo foi baseado na cromatografia gasosa de alta resolução, cromatografia gasosa de alta resolução com detetor seletivo de massas e na técnica de MEFS usando coluna capilar de fase estacionária não polar e com o programa de deconvolução de espectros, permitindo uma melhor identificação de todos os constituintes, inclusive dos compostos co-eluídos, contaminados e com ruído.

Na avaliação biológica do óleo essencial de mirra este apresentou-se não citotóxico, inativo para pleurisia induzida por carragenina e Lipopolissacarideo (LPS) “in vivo”, com atividade antiinflamatória de 56,69% para edema de pata em camundongos “in vivo”, atividade tripanomicida para *Leishmania amazonensis* na forma promastigota com $DL_{50} = 0,47$ mg/mL e *Trypanosoma cruzi* de 100% na concentração de 0,06 mg/mL., e atividade antineoplásica em 5 linhagens tumorais.

ABSTRACT

Conventional extractions techniques use large amounts of material, long extraction times and heating. Solid-Phase Microextraction (SPME) has many advantages in comparison with these techniques, since it is a softer method than it doesn't generate artefact, requests small amounts of samples, faster and economical techniques.

The study the chemical composition of essential oil from leaves of *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (mirra), we identified 115 constituent (aldehyde, epoxide, acetates, monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes), 66 was extraction technique for coobação, 5 was technique SPME and 44 was program of automated mass deconvolution and identification system (AMDIS)

This study was based in high resolution gas chromatography, high resolution gas chromatography of with mass selective detector and technique of SPME, in the capillary column of non-polar stationary phase (HP-5) and a Automated Mass Deconvoluiton and Identification System (AMDIS) was used allowing better constituents identification, included co-eluted components contaminated and noise.

In the biological activity of the essential oil of mirra showed no cytotoxic, activity for pleurisy induced by carragenina and LPS "in vivo", with activity anti-inflammatory of 56,69% in the paw edema mice "in vivo". Activity tripanomicida for *Leishmania amazonensis* forms promastigota with $LD_{50} = 0,47$ mg/mL and *Trypanosoma cruzi* of 100% in the concentration of 0,06 mg/mL., and antitumor activity in 5 tumor cells.

INTRODUÇÃO GERAL

Foi procurando vencer as doenças que a sociedade primitiva começou a incorporar ao seu elenco de terapias, além de rituais de magias e misticismos, a utilização das plantas do seu ambiente, selecionando algumas para sua alimentação e rejeitando outras por serem prejudiciais ou tóxicas. Da mesma maneira, experimentou os vegetais para aliviar seus males ou mesmo seu tédio: usando-os como infusos, chás, beberagens e emplastros. Este método de tentativa, erros e acertos ou forma empírica de aquisição de conhecimento não deve ser desprezado, basta lembrar que através dele a humanidade deu seu primeiro passo na direção da medicina popular, surgindo descobertas fundamentais para a sobrevivência do homem (Simões, 1989).

Encontram-se registros do uso de plantas medicinais em achados arqueológicos, citações bíblicas, poesias, mitologia de gregos e romanos e até mesmo nas obras de Shakespeare (Mattos, 1983).

Esses registros do uso das plantas como medicamentos é resultado do acúmulo secular de conhecimentos sobre a ação dos vegetais por diversos grupos étnicos, onde as espécies utilizadas como plantas especiais diferem conforme as características culturais dos povos.

O interesse pelas ervas* tornou-se muito grande durante os séculos XV, XVI e XVII, nesta época, surgiram os grandes tratados (dicionários de ervas*). que reuniam informações botânicas, instruções para o preparo de remédios, receitas de cozinha e usos gerais. Na época, os estudiosos da fitoterapia apresentavam algumas teorias curiosas, uma delas baseava-se na semelhança, ou seja, cada planta ou cada parte da planta era empregada na cura de males que afetavam o órgão humano a que se assemelhava (Mattos,1983).

Assim toda a Europa durante anos fez uso da prática da medicina popular, envolvendo plantas baseada na ausência real de conhecimento dos seus valores medicinais e as lembranças desta “ignorância” persistem até hoje. Além do mais, há evidências de que os escravos e camponeses que viviam nas zonas rurais detinham um bom conhecimento, adquirido por seus ancestrais durante séculos, das propriedades medicinais destas plantas crescidas em suas localidades.

Entretanto, foi na Inglaterra no final do século XVII e início do século XVIII, com a mudança do feudalismo para o capitalismo, que os produtos de ervas isto é, preparações medicinais pré-embaladas, feitas a partir de plantas em grandes quantidades foram vendidas ao público sem que fosse feito qualquer diagnóstico da doença. O crescimento industrial fez com que houvesse um êxodo rural, fornecendo oportunidade para inescrupulosos comerciantes explorarem a ignorância do povo agora formando a grande classe trabalhadora (assalariado) que foi perdendo suas ligações com o campo, mas que acreditavam nos valores medicinais das plantas (Simões, 1989).

* Ervas =Neste trabalho planta medicinal

Com o passar dos anos, o desenvolvimento das navegações levou a importação de muitas drogas vindas de todas as partes do mundo, isto tornou impossível para membros do público em geral, vivendo nas áreas urbanas, distinguir as ervas genuínas e até mesmo identificar os curandeiros dos herboristas impostores, ocasionando assim muitas fraudes de drogas brutas e plantas medicinais. Nesta época surgiram as pílulas de ervas, os remédios contendo pequenas doses de um grande número de extratos de ervas, sendo a posologia específica para cada cliente em particular.

Em meados do século XIX, surgiu o selo de imposto o qual gerou uma enorme fonte de renda para o governo. Assim, como as preparações das ervas haviam muitas formulações diferentes baseadas, principalmente, em remédios medievais, alguns deles eficazes outros não.

Com base nestes conhecimentos acumulados pela medicina popular, os químicos sintetizaram milhares de novas substâncias, muitas das quais foram rapidamente aproveitadas na medicina científica. São exemplos os barbitúricos, os anestésicos, os antiparasitários, os analgésicos. As bebidas estimulantes, como café (*Coffe arabica* L.), o chá (*Thea sinensis* Sims.), a erva-mate (*Ilex paraguariensis* Si. Hil.), a cola (*Cola* spp.), o cacau (*Theobroma cacao* L.) e outros (Simões, 1989).

No começo do século XX surgiram restrições a certas curas pela medicina popular como: câncer, tuberculose e doenças venéreas. O selo de imposto foi removido e os principais ingredientes dos produtos eram mostrados no rótulo, expondo as preparações fraudulentas. Entretanto, a venda de produtos de ervas permaneceram altas até 1948. O sucesso dos novos medicamentos no tratamento de doenças e sintomas para os quais as plantas medicinais e seus extratos exibiam pouca eficácia, fez com que sua utilização fosse freqüentemente menosprezada e até ridicularizada por profissionais da área de saúde (Shellord, 1987).

Nos últimos 20 anos, a busca do homem por uma vida mais saudável fez ressurgir o interesse pelos remédios de plantas, o que deu a oportunidade ao comércio de novos produtos com embalagens mais atraentes e uma ampla faixa de anúncios nos meios de comunicação. Infelizmente quase tudo que se tem escrito relacionando plantas e suas propriedades medicinais é feito por pessoas com pouco conhecimento a respeito e as informações ainda vem sendo tiradas de livros publicados no século passado (Shellard, 1987).

Contudo a situação atual não é a mesma de 100-150 anos atrás, em 1968, por exemplo, foi criada uma legislação para um controle maior de todos os tipos de medicamentos. Entre outras classificações, ficou determinado que toda substância orgânica sintética necessitava de uma avaliação química e biológica cara e extensa envolvendo propriedades farmacológicas, toxicidade aguda e crônica, efeito na fertilidade, respostas mutagênicas e carcinogênicas, bem como suas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas. Os processos de produção de medicamentos também foram submetidos à controles de qualidade e quando esta legislação tornou-se efetiva para os produtos de ervas, estes tiveram uma licença temporária para poderem ser comercializados, causando assim uma crise entre seus produtores (Shellard, 1987).

A pesquisa acadêmica trouxe novos conhecimentos, pôr exemplo: com o desenvolvimento de modernas técnicas cromatográficas os problemas de controle de

qualidade puderam ser resolvidos em grande parte. É fundamental a interação das áreas de botânica, química e farmacologia, pois estas, abrangem conhecimento indispensável para a utilização segura de plantas medicinais.

Hoje, embora cientificamente duvidoso, o uso dessas ervas não se restringe às zonas rurais ou regiões desprovidas de assistência médica. O comércio intenso em locais públicos e a venda de formas simples em farmácias e supermercados são fatos que indicam que ervas estão sendo utilizadas intensamente no meio urbano, como forma alternativa ou complementar dos medicamentos da medicina oficial. (Shellard, 1987).

Importância da Medicina Popular no Brasil

A utilização das plantas medicinais no Brasil tem origem na cultura dos diversos povos que habitavam o país; ocorrendo três influências quais sejam: a do colonizador português, dos índios e dos negros.

A contribuição do índio com sua fitoterapia mística, fundamental, principalmente no sertão do Ceará, onde a influência do negro foi menor. Um valioso acervo sobre as propriedades das plantas de nossa flora foi levado para a Europa pelos jesuítas. Até hoje essas valiosas informações existem nos sertões do Ceará onde cultua-se os três tipos de mezinheiros*: o curandeiro, o rezador e o raizeiro, os quais diferem entre si por características bem marcadas:

- o curandeiro utiliza garrafadas formuladas com álcool que são ministradas aos enfermos acompanhados de rituais mágicos.
- o rezador destaca-se pelo poder da oração e das práticas mágicas, sem a utilização de remédios.
- o raizeiro, vende artigos diversos como: raízes, folhas e cascas de plantas medicinais.

A assimilação do conhecimento desses povos representa papel importante para o surgimento de uma medicina popular rica e original. Porém o uso pouco cuidadoso e a falta de preocupação com o cultivo, leva a exploração predatória de algumas plantas “milagrosas”, colocando-as em risco de extinção, como pôr exemplo o ipê roxo (*Taubebuia avellanadae* Lorents ex. Grisebach) (Simões, 1989).

É preciso lembrar que o Brasil possui um bom número de espécies vegetais de renomado uso medicinal. Assim mesmo são reduzidíssimas as descobertas de princípios terapêuticos baseados em nossa flora (Gottlieb, 1983). Como contradição é importador de muitos produtos contendo matérias-primas vegetais, a maior riqueza renovável do país. Tais produtos poderiam certamente ser fornecidos por espécies aqui existentes, reduzindo-se a importação e seus honorários.

O uso dessa matéria-prima vegetal é feito em grande parte pelas indústrias de extração de óleos essenciais de valor aromatizante e anti-séptico, na conservação de alimentos industrializados. Na indústria farmacêutica e de corantes, um bom exemplo é o mentol, extraído da *Mentha arvensis* var. *piperascens*, utilizado como anti-séptico e o

* Mezinheiro: Homem que faz ou aplica remédios caseiros

capim limão (*Cymbopogon citratus*) muito utilizado na indústria de perfumaria e farmácia (Shellord. 1987).

Contribuições da Botânica, da Química e da Farmacologia

As áreas de botânica, química e farmacologia detêm conhecimentos indispensáveis para a utilização segura das plantas medicinais. É função dos botânicos providenciar a identificação correta e a descrição da morfologia das espécies vegetais, além da compilação de dados em herbários, onde são obtidas informações sobre a distribuição geográfica e a fenologia das mesmas.

Os farmacêuticos e os químicos especializados em produtos naturais extraem, isolam, purificam e identificam os componentes químicos, e com o auxílio dos farmacologistas verificam as ações biológicas e farmacológicas desses princípios ativos e/ou de extratos vegetais, bem como avaliam a sua eventual toxicidade. Para que se obtenha uma informação segura sobre as plantas medicinais seria fundamental a união dos profissionais que atuam nas áreas de etnobotânica e etnofarmacologia, recolhendo dados junto a população sobre a utilização das plantas medicinais (Simões, 1989).

OBJETIVOS

Determinar a composição química do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. extraído por coação e por microextração em fase sólida (MEFS), comparar os resultados dessas duas técnicas. Bem como, identificar seus constituintes utilizando a cromatografia gasosa de alta resolução, cromatografia gasosa de alta resolução com o detector seletivo de massas e o sistema automático de deconvolução e identificação de espectros.

Avaliar o efeito antiinflamatório do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. nos modelos de pleurisia induzida por carragenina e Lipopolissacarídeo (LPS) “in vivo” e de edema de pata de camundongos “in vivo”. O efeito tripanomicida em *Leishmania amazonensis*, sob a forma promastigotas e *Trypanosoma cruzi*, sob a forma trimastigota, bem como, o efeito antineoplásico “in vitro”.

RESULTADO E DISCUSSÃO DO CAPITULO I

A mirra é uma planta aromática, arbustiva de cheiro forte e característico, selecionada para cultivo e estudo por ser usada popularmente em Manaus para tratamento de doenças estomacais.

O cultivo e a coleta do material utilizado nesta tese foi feita no Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Ocidental EMBRAPA-CPAA em dezembro de 1996. Em condições de experimento essas plantas crescem 1,60m de altura, são de fácil reprodução através de estacas, mostram-se tolerantes ao déficit hídrico e tem como propriedades do tronco e ramos ficarem lenhosos à proporção que ficam adultas.

Conhecida popularmente como mirra, foi classificada previamente através da comparação de exsicatas (da nossa planta com as do herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro) como *Moschosma riparium* Hochst. pela botânica Dr^a. Elsie Franklin Guimarães, especialista em Piperaceae e Bióloga do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Por não ser especialista na família Lamiaceae a Dr^a. Elsie nos orientou para enviarmos uma exsicata para Londres (Inglaterra), aos cuidados do Dr. Harold Harvest, botânico especialista em Lamiaceae. A planta foi corretamente identificada como *Tetradenia riparia* Hochstetter. Codd.

Sua exsicata encontra-se depositada no herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro com o número de registro RB 331320.(Figura .5, p.19).

Nome popular: Mirra (em Manaus)

Família: Lamiaceae

Gênero: *Tetradenia*

Espécie: *riparia*

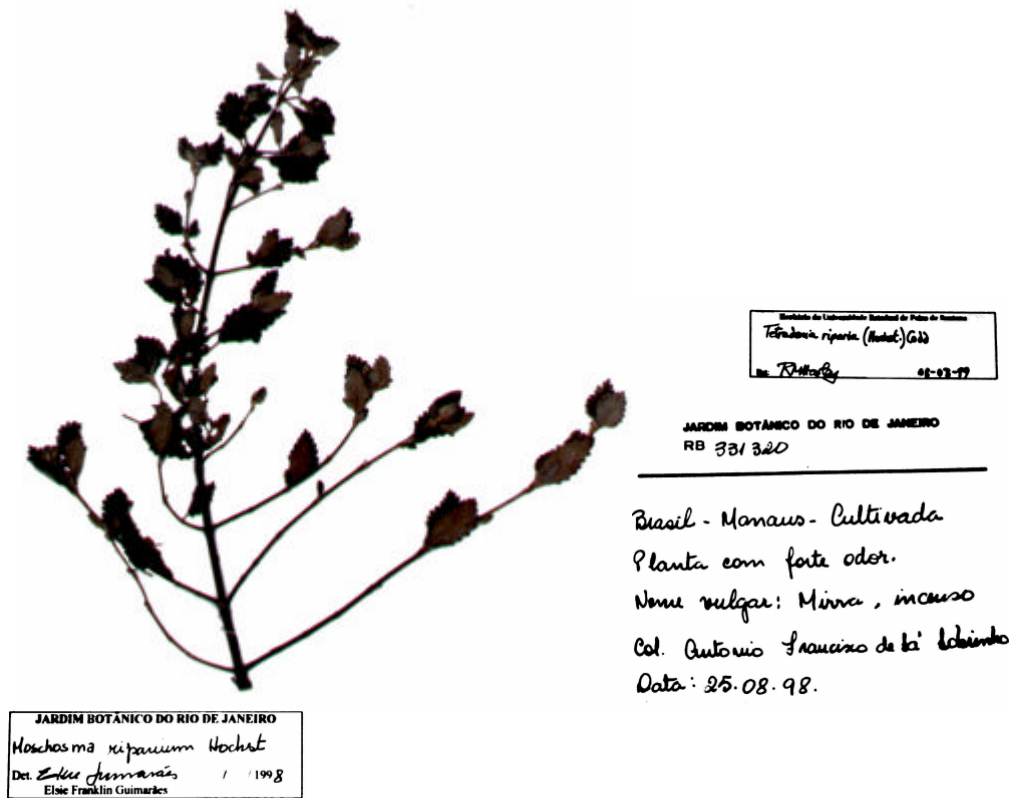


Figura 5: Foto da exsicata de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd, depositada no herbário de Jardim Botânico do Rio de Janeiro RB-331320.

Através de consulta bibliográfica, verificamos que este gênero é conhecido com outros nomes: *Iboza riparia*, *Tetradenia riparia* (Hochst.) N.E.Br e *Moschosma riparium* Hochst (como classificado pela Dr^a Elsie). Fomos orientados, entretanto pelo Dr. Harold Harvest que apesar dos nomes sinônimos estarem corretos o nome atual dessa espécie é *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd.

Obtenção do óleo

Em aproximadamente 5 horas de destilação contínua, o óleo obtido, de cor alaranjada, foi armazenado em vidro âmbar a temperatura de 18°C até ser enviado para o laboratório de óleos essenciais da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Esse óleo essencial teve um rendimento de 0,39% a partir de 1Kg de folhas frescas.

As determinações dos índices físico-químicos dos óleo essenciais, são até hoje consideradas pela indústria como indispensáveis para a avaliação da qualidade dos óleos essenciais. Um exemplo é a *Salvia officinalis* (dextrógira) pode ser distinguida da *Salvia triloba* (levógira), pelas rotações ópticas (Guenther, 1952a). Porém, quando trabalhamos a qualidade química dos óleos essenciais, essas determinações apesar de úteis não são necessárias. A literatura nos mostra que os índices físico-químicos para identificação dos óleos essenciais até o aparecimento da cromatografia gasosa acoplada com detetor seletivo de massas, eram importantes padrões de referência, o que não ocorre nos trabalhos atuais.

Entretanto, algumas revistas e jornais exigem esses índices físico-químicos, como é o caso da revista *Planta Médica*. Por essa razão medimos o índice de refração, a densidade relativa e a rotação óptica do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd (Tabela 1).

Tabela 1: Índices físico químicos do óleo de *Tetradenia riparia* Hochstetter. Codd.

Índices Físico-Químicos			
	Índice de refração	Rotação óptica	Densidade relativa
	n_D^{20}	α_D^{20}	$d_{20}^{20} \text{ g/cm}^3$
Óleo Essencial			
<i>Tetradenia riparia</i> Hochstetter Codd (estudada)	1.2916	-8.88° (c, 1.0, EtOH)	0,9404
<i>Tetradenia riparia</i> (William, 1997)	1.4685	+ 6.4° (c, 1.0, EtOH)	0,8874

n_D^{20} - Índice de refração da água destilada a 20° C e da substância a 20° C

α_D^{20} - Rotação óptica da água destilada a 20° C e da substância a 20° C

d_{20}^{20} - Densidade relativa da água destilada a 20° C e da substância a 20° C

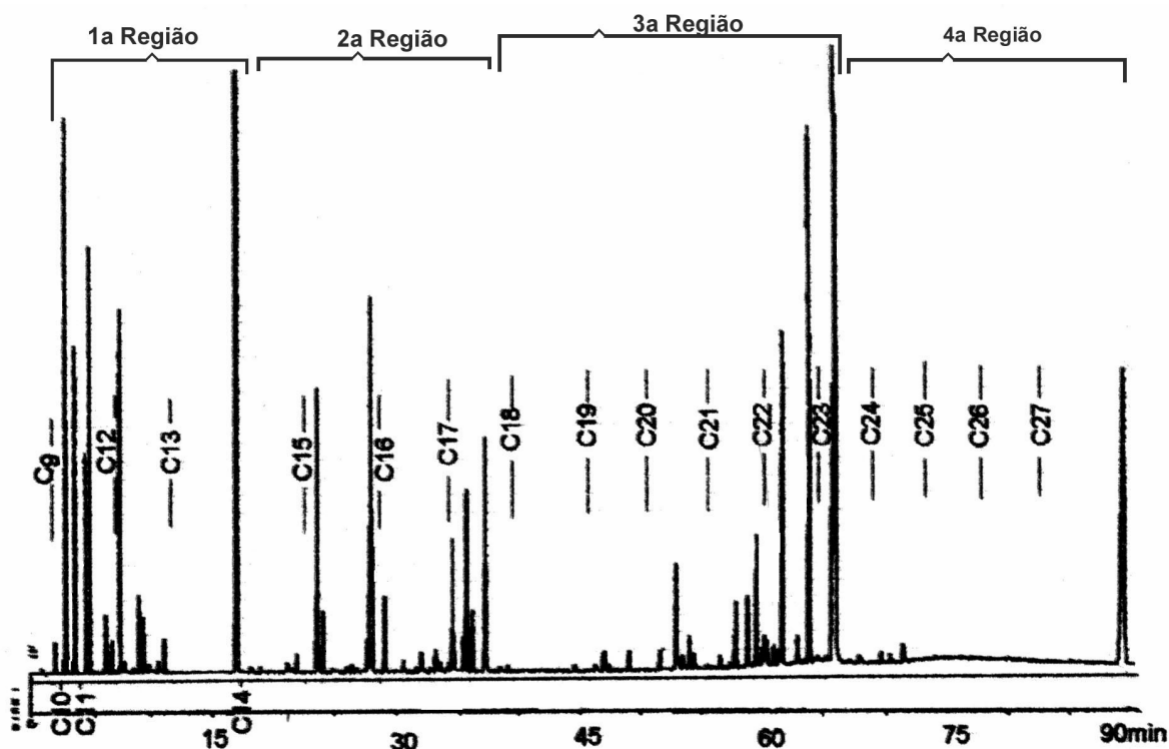
**ANÁLISE DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE
TETRADENIA RIPARIA HOCHSTETTER CODD. EXTRAÍDOS POR
COOBAÇÃO E ANALISADO EM COLUNA DE CROMATOGRAFIA GASOSA
DE POLIETILENO GLICOL (HP-FFAP)**

Para uma melhor análise do Cromatograma-1(p.22) e do cromatograma de íons totais Cromatograma-2, (p.23), do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (mirra) obtido por coobação e analisado em coluna de fase estacionária polar, polietileno glicol (HP-FFAP), dividiu-se o cromatograma e o CIT em 4 regiões (Tabela 2).

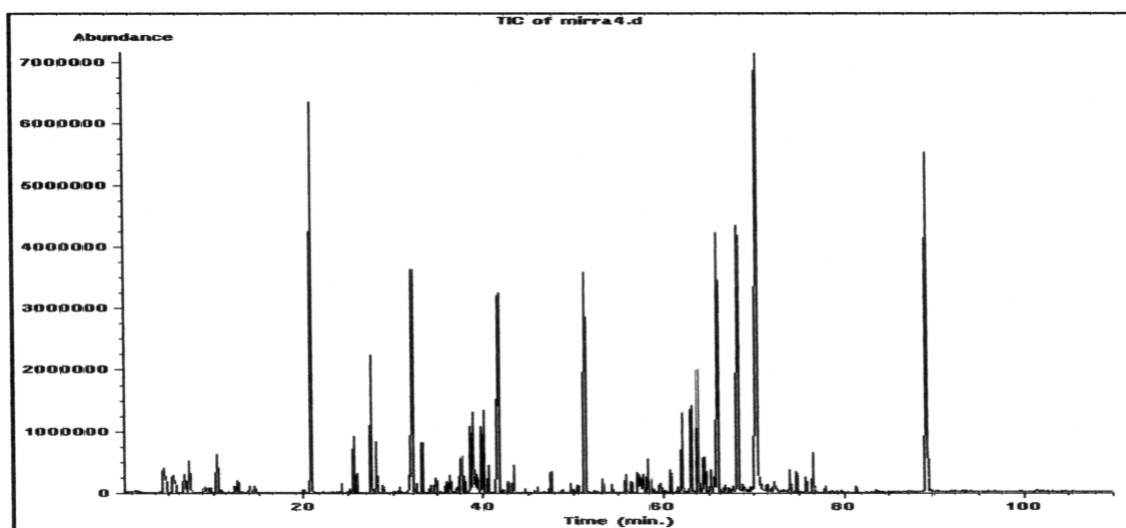
Quando comparamos o Cromatograma-1 (p.22) e o Cromatograma-2 (p.23), observamos uma variação na concentração dos constituintes da 1ª região cromatográfica (monoterpenos), que ocorre provavelmente devido a perda, no armazenamento ou na injeção desses constituintes, pois os mesmos são muito voláteis.

Regiões cromatográficas	Tempo de Retenção – t_R em minutos	Varredura no CIT (SCAN)
1	2,218 a 17,095	390 a 1898
2	17,332 a 39,539	1899 a 3803
3	45,873 a 69,063	3804 a 5998
4	70,431 a 90,356	5999 a 7637

Tabela 2: Divisão do cromatograma e do CIT do óleo essencial de mirra, (obtido por coobação). Condições de análise: coluna polar (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, FID 280°C, gás de arraste hidrogênio, fluxo da coluna 1mL / min “split” de 1:100), dividido em 4 regiões.

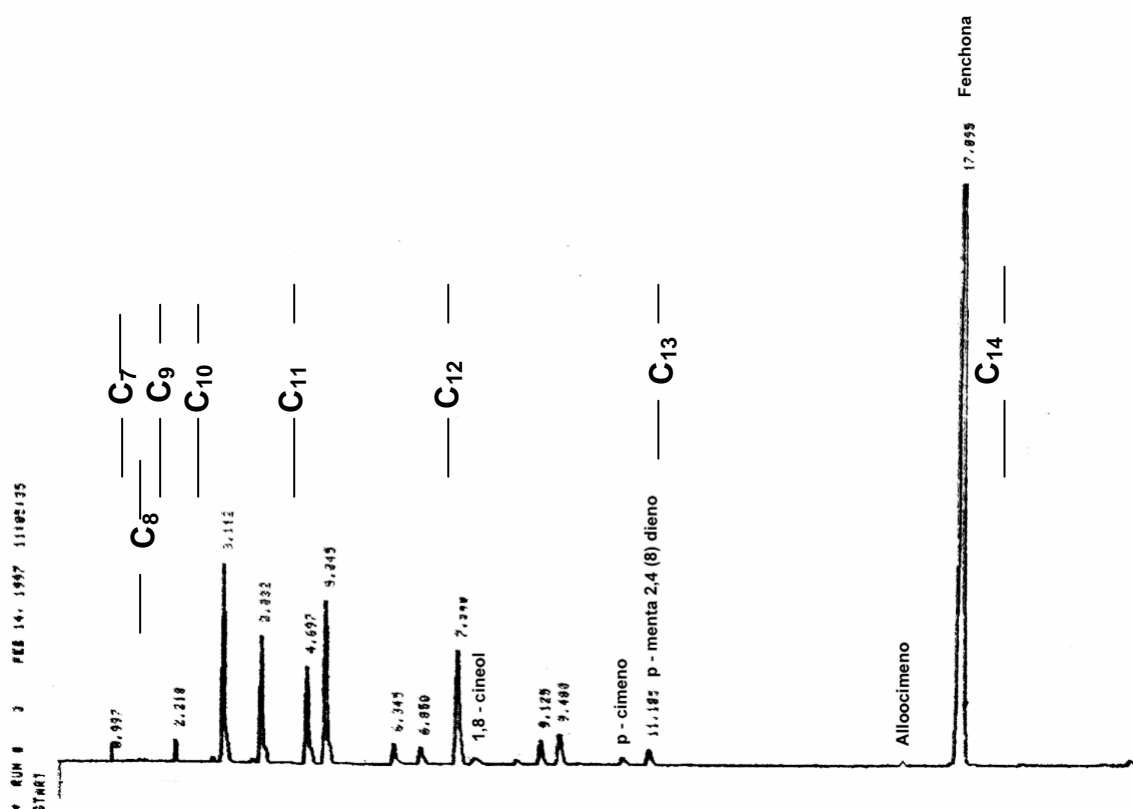


Cromatograma-1: CGAR do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd, (obtido por coação) e as marcações dos lugares onde eluíram os padrões de *n*-alcanos de C₇ a C₂₇. Condições de análise: coluna polar (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μm, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, FID 280°C, gás de arraste hidrogênio, fluxo da coluna 1mL / min “split” de 1:100).

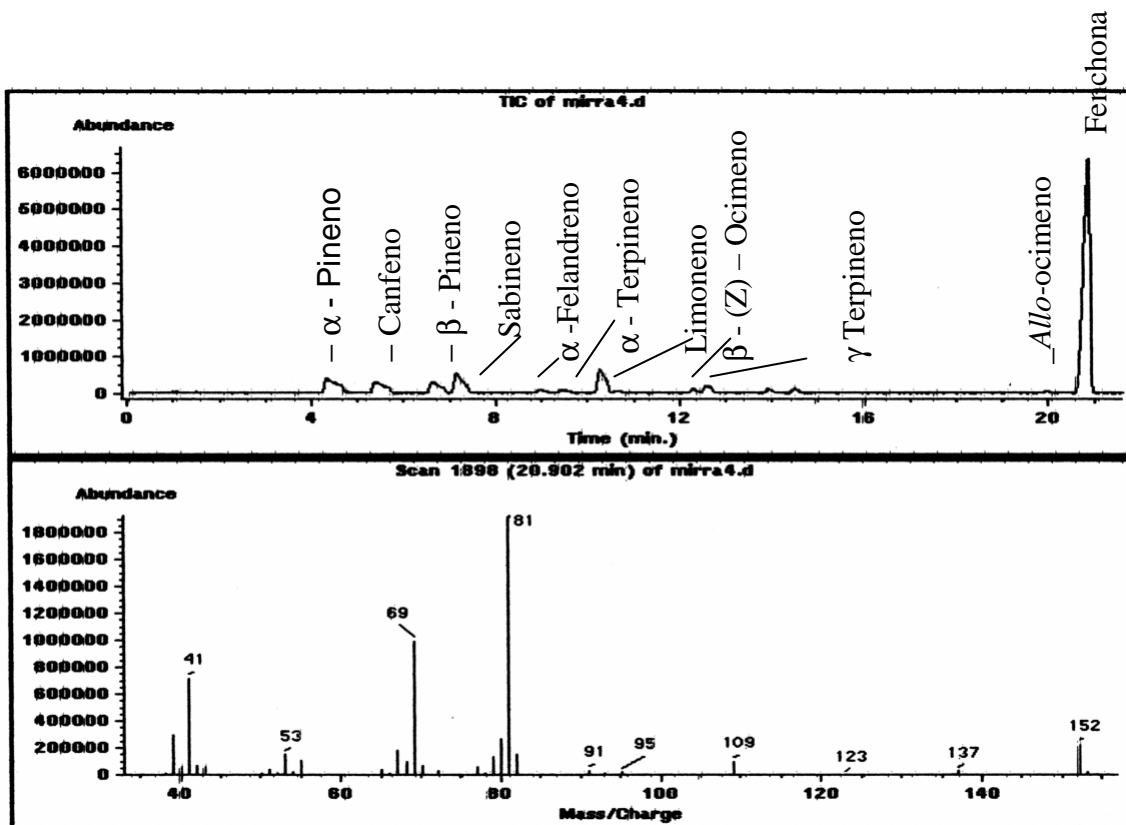


Cromatograma-2: CIT do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd.(obtido por coação). Condições de análise: coluna polar (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μm, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min “split” de 1:100).

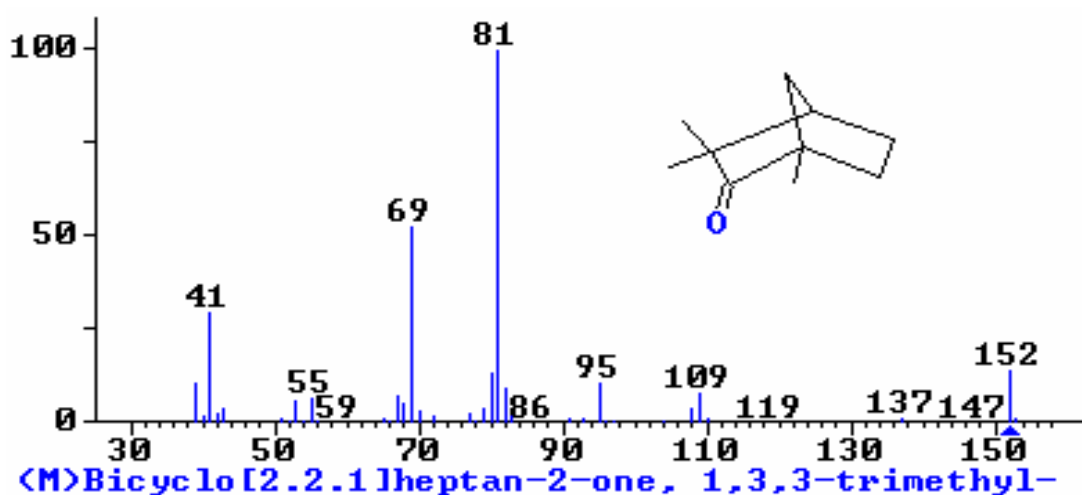
No primeiro intervalo de tempo de retenção (t_R 2,218 a 17,095 minutos), todos os 14 picos (Cromatograma-3, p.23) foram identificados por comparação automática e visual dos espectros de massas obtidos com os das espectrotescas "Wiley," "NIST" e a literatura. Porém, apenas 9 picos (α -pineno, canfeno, β -pineno, sabineno, α -felandreno, α -terpineno, limoneno, β -(Z)-ocimeno e o γ -terpineno) (64,2%) tiveram suas identificações confirmadas com seus respectivos índice de retenção relativo. Os 5 picos restante (35,8%) não estão confirmados, sendo 4 deles (1,8-cineol, p-cimeno, p-menta-2,4(8) dieno e *allo*-ocimeno) por não terem sido integrados durante a corrida cromatográfica, dificultando o cálculo de seus índices de retenção, e 1 deles a fenchona (t_R 17,095 min) é um monoterpene que aparece como um pico dos mais intensos e com espectro de massas bem característico (cromatograma-4, p.24), sem deixar dúvidas nas comparações com as espectrotescas (Espectro-1, p.24). Entretanto, apresenta apenas um trabalho na literatura com seu índice de retenção em coluna HP-FFAP (Comitte, 1997).



Cromatograma-3: CGAR da 1ª região (t_R 2,218 a 17,095 min.) do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (obtido por coobação), com os padrões C7 a C14 marcados. Condições de análise: coluna polar (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, FID 280°C, gás de arraste hidrogênio, fluxo da coluna 1ml / min "split" de 1:100).



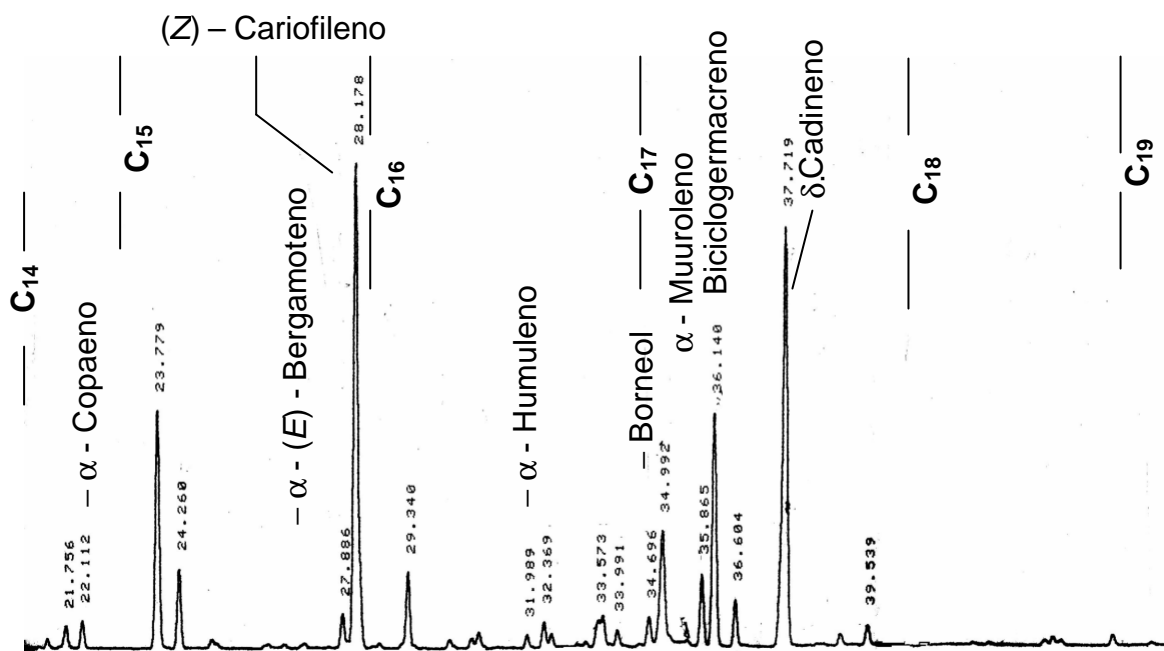
Cromatograma 4: Expansão da 1ª região do CIT do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μm, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1ml / min., “split” de 1:100), e o espectro de massas da fenchona, leitura de varredura 1898.



Espectro 1: E.M. da fenchona, obtido na espectroteca “NIST”

A segunda região compreendida entre os t_R 17,332 a 39,539 minutos, dos hidrocarbonetos C_{14} ao C_{19} (Cromatograma 5, p. 25), além dos problemas discutidos na 1ª região, começamos a deparar com outras dificuldades, a reprodutibilidade dos índices de retenção relativos, quando comparados com a literatura. Neste intervalo de

tempo de retenção, dos 31 picos e seus respectivos espectros de massas, apenas 8 (α -copaeno, α - (*E*)-bergamoteno, (*Z*)-cariofileno, α -humuleno, borneol, α -muuroleno, biciclogermacreno e o δ -cadineno) (25,8%), foram corretamente identificados, com seus respectivos índices de retenção relativos e seus espectros de massas quando comparados com a literatura (Adams, 1995). Os 23 picos restantes (74,2 %), possuem índices de retenções relatados na literatura, com uma faixa de variação muito grande, o que na prática da comparação dos índices de retenção relativos, não leva a confiabilidade da identificação.



Cromatograma 5: CGAR da 2ª região (t_R 17,332 e 49,539 min.) do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd, (obtido por coação), com os padrões C₁₅ a C₁₉ marcados. Condições de análise: coluna polar (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, FID 280°C, gás de arraste hidrogênio, fluxo da coluna 1ml / min., “split” de 1:100).

A terceira região, apresenta o maior número de substâncias eluídas, também com problemas de reprodutibilidade de índice de retenção, está compreendida entre os t_R 45,873 e 69,063 minutos dos hidrocarbonetos C₁₉ ao C₂₃ (Cromatograma 6, p.27). Foram obtidos 33 picos, e seus respectivos espectros de massas. Apenas 5 picos (espatulenol, *EPI*- α -cadinol, *EPI*- α -muurolol, α -muurolol e 9-*EPI*-(*E*)-cariofileno-14-hidroxi) (15,1%) foram identificados pelos seus espectros de massa e pelos seus índices de retenção relativos, uma vez que os mesmos, apresentam pequenas variações quando comparados com a literatura (Tabela 3, p.27). Os outros 28 picos (74,9%) dessa região apresentaram grande variação de índice de retenção, quando comparados com a literatura (Martins, 1998, Torquillo, 1997), ou não têm seus índices de retenção publicados.

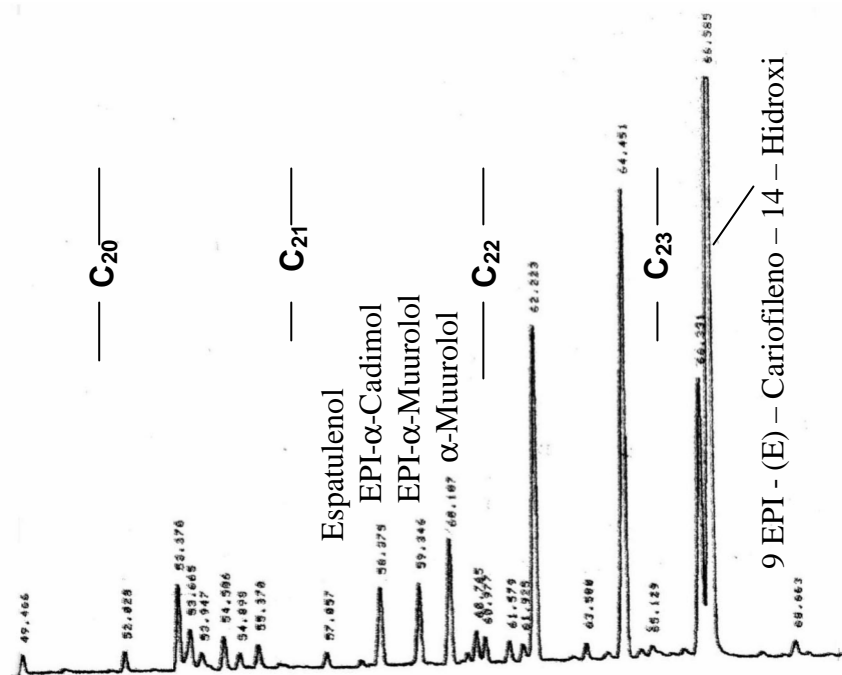
Tabela 3: Substâncias identificadas na 3ª região do cromatograma do óleo essencial de mirra, obtido por coobação (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, temperatura do injetor de 250°C, FID 280°C, hidrogênio, fluxo da coluna de 1mL / min e “split” de 1:100).

Substância / t_R (minutos)	Índice de retenção relativo	Índice de retenção relativo (Lit.1)	Índice de retenção relativo (Lit.2)	Índice de retenção relativo (Lit.3)
Espatulenol / 57.057 min	2125	2103	2110	2120
<i>EPI</i> - α -cadinol / 58.375 min	2168	2161	2167	2155
<i>EPI</i> - α -muurolol / 59.346 min	2184	2165	2177	2181
α -muurolol / 60.107 min	2198	2230	2182	2167
α -cadinol / 61.925 min	2229	2218	2224	-

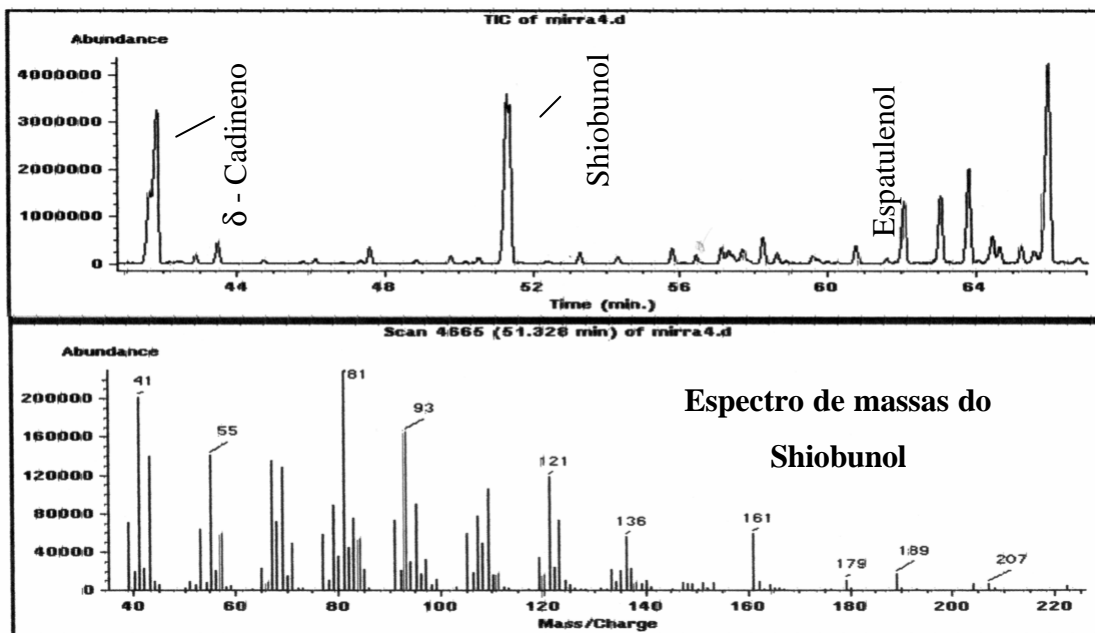
Lit. 1 - (Torquillo, 1995), Lit. 2 - (Martins, 1998), Lit. 3 - (Jean, 1995)

Nessa região (Cromatograma 6, p.27) encontramos 3 picos com teor acima de 1,4 % cada, sendo que dois deles (t_r 62,223 e 64,451min.) não conseguimos identificar pelos seus espectros de massas. O pico de tempo de retenção 51.326 minutos (Cromatograma 7, p.27) apresentou um espectro de massas, que após a busca automática com a espectroteca da estação de dados do espectrômetro de massas “Wiley” , forneceu 87 % de probabilidade de ser o shiobunol.

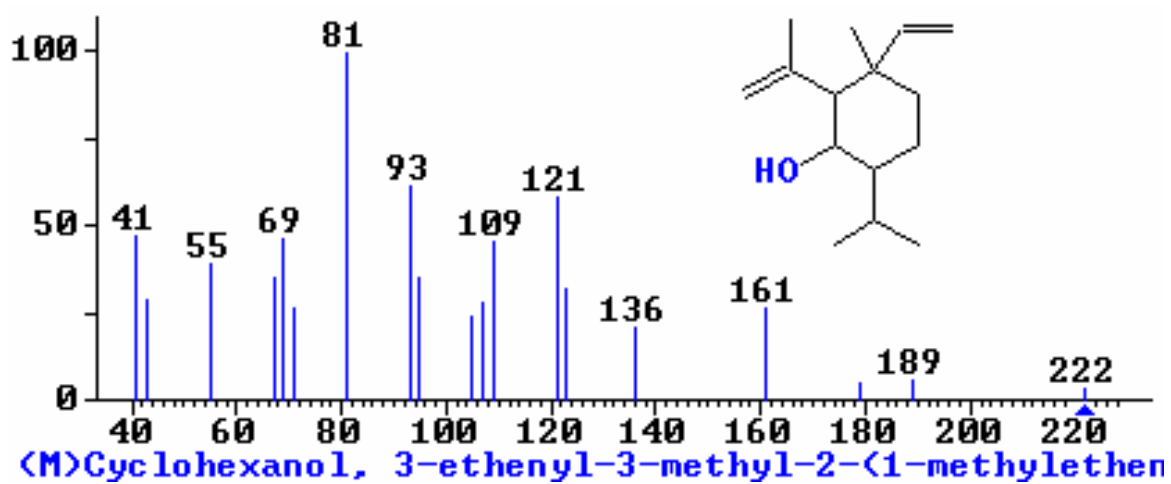
Pela comparação do espectro de massas obtido (Cromatograma 7, p.27) com o da espectroteca “NIST” (Espectro 2, p.28) e sua fragmentação (Quadro 1, p.29), podemos sugerir que o pico de tempo de retenção 51.326 minutos é o shiobunol, cuja fragmentação foi proposta por Martins (1998).



Cromatograma 6: CGAR da 3ª região (t_R 39,539 e 69,063 min.) do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd, (obtido por coação) com os padrões C₁₉ a C₂₄ marcados. Condições de análise: coluna polar (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, FID 280°C, gás de arraste hidrogênio, fluxo da coluna 1ml / min., “split” de 1:100).

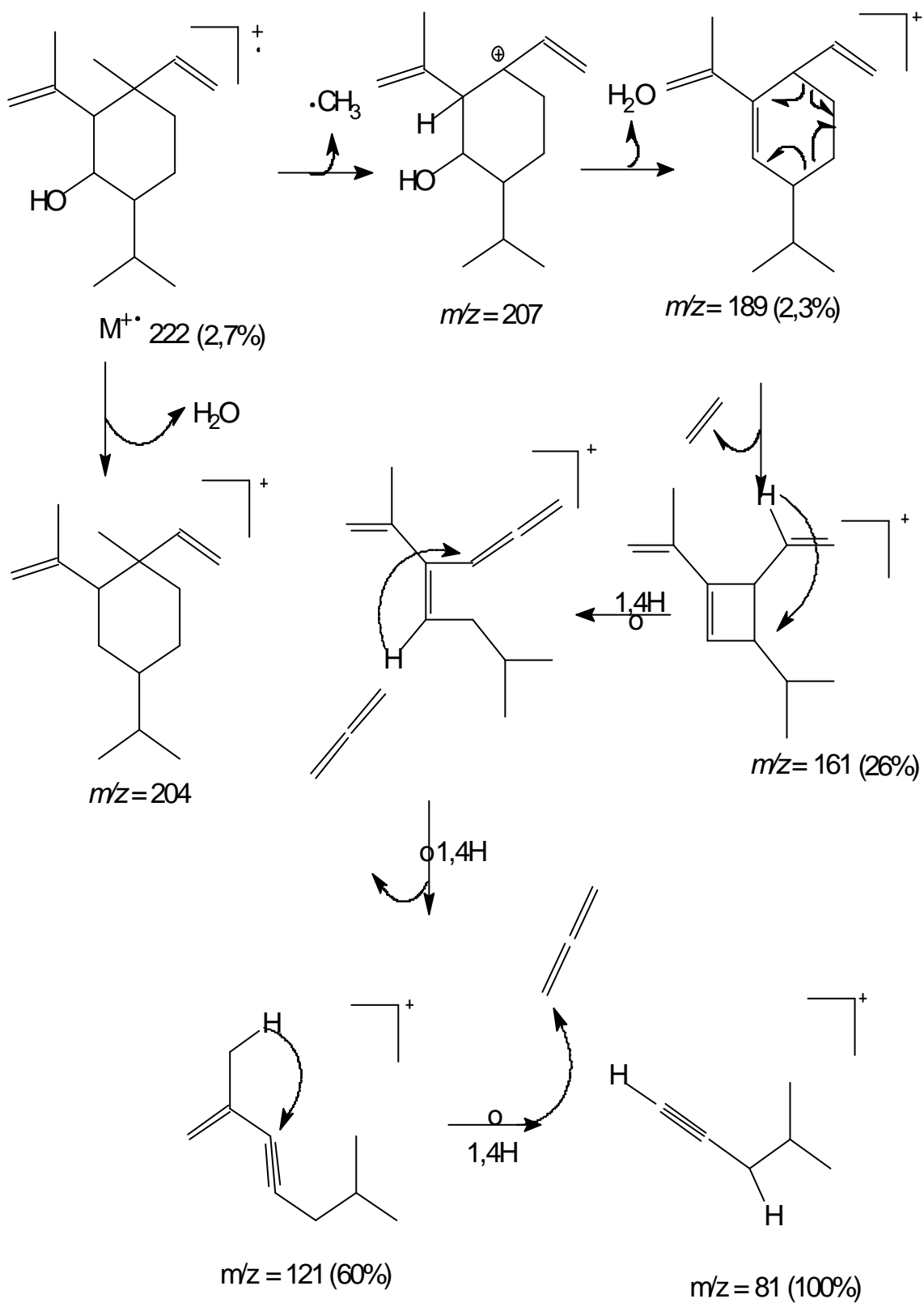


Cromatograma 7: Expansão da 3ª região do CIT do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Cood. (obtido por coação). Condições de análise: coluna polar (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, FID 280°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1ml / min., “split” de 1:100) e o espectro de massas do shiobunol leitura de varredura 4586.



Espectro 2: E.M. do Shiobunol, obtido na espectroteca "NIST".

Quadro 1: Proposta de fragmentação do Shiobunol

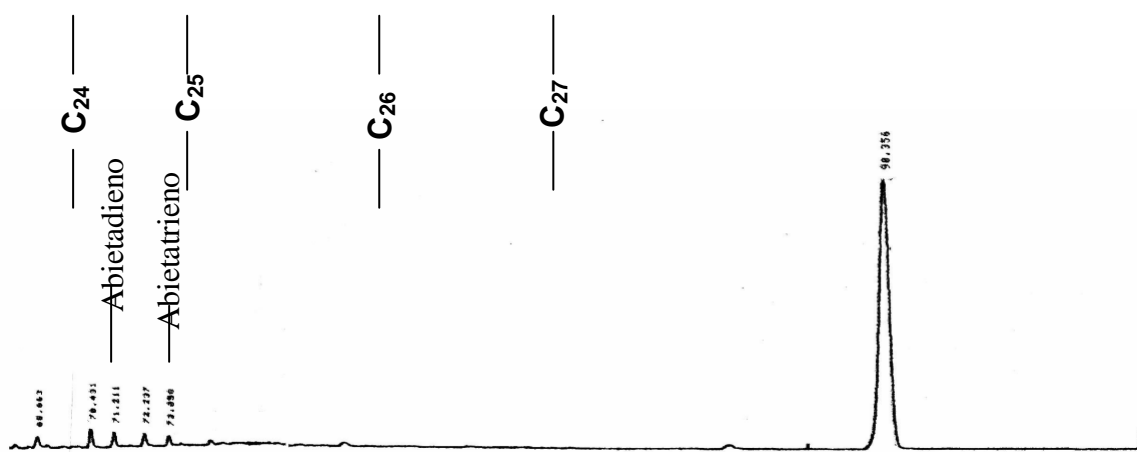


Na quarta e última região que vai do t_R 70,431 a 90,356 minutos (Cromatograma 8, p.30), encontramos espectros de massas com peso molecular não muito comuns em óleos essenciais, e que caracterizamos como diterpenos (Tabela 4).

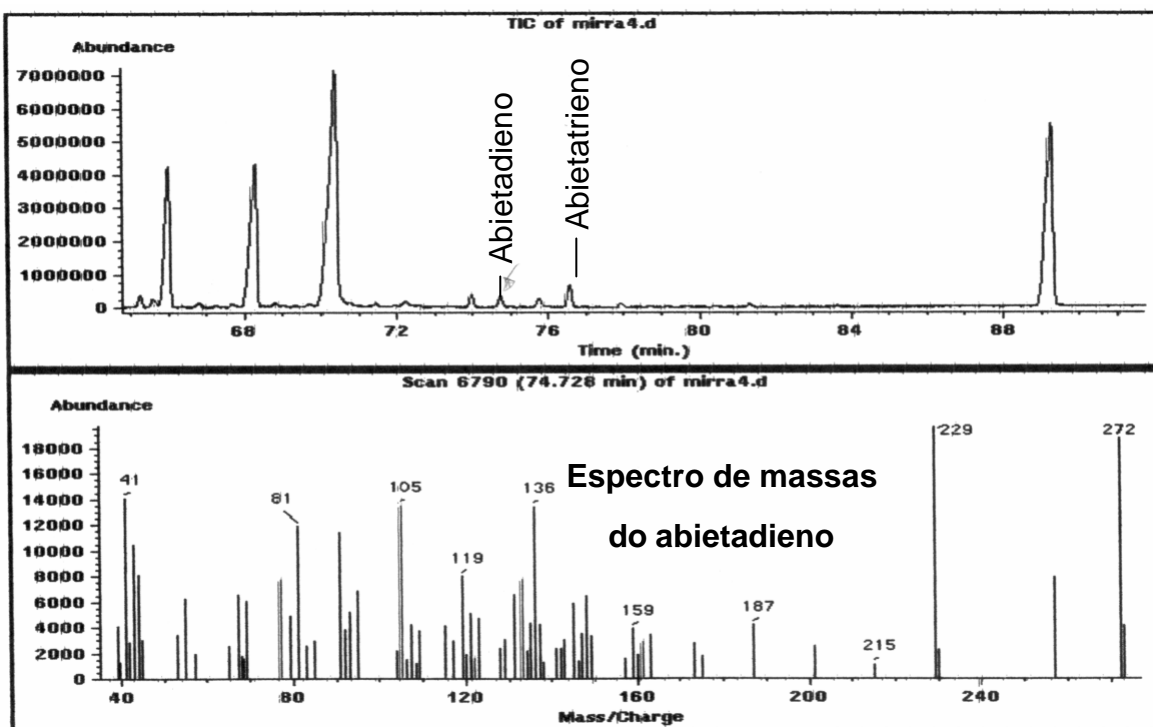
Tabela 4: Tempos de retenção de alguns dos picos encontrados na quarta região do cromatograma do óleo essencial de mirra, (obtido por coobação). Condições de análise: coluna polar (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, temperatura do injetor de 250°C, FID 280°C, gás de arraste hidrogênio, fluxo da coluna de 1mL / min e “split” de 1:100).

Tempo de retenção	Peso molecular
70.431 min	270
71.211 min	272
72.237 min	272
73.058 min	270
90.356 min	288

Pela comparação dos espectros de massas desses tempos de retenção, com espectro de massas da literatura (Adams,1995) (Espectro-3, p. 31), identificamos o abietadieno t_R 71,211 min. (Cromatograma 9, p.31). E com o espectro de massas da espectroteca “NIST “ (Espectro 5, p.32) e da literatura (Adams,1995) (Espectro 4, p.32), o abietatrieno t_R 73,058 min (Espectro 4, p.32).

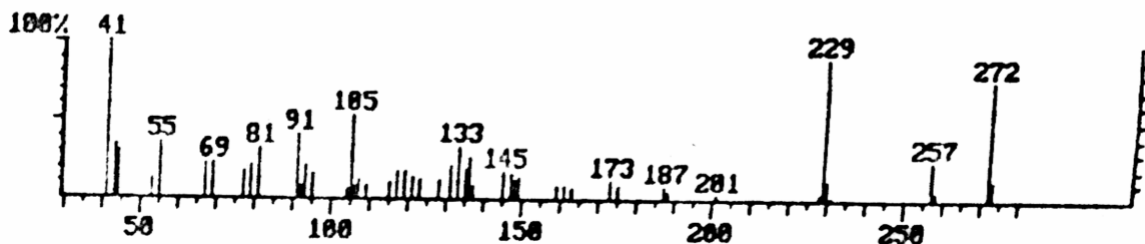
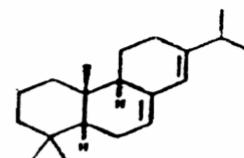


Cromatograma 8: CGAR da 4ª região (t_R 70,431 e 90,356 min.) do cromatograma do óleo essencial de mirra, (obtido por coobação). Condições de análise: coluna polar (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, temperatura do injetor de 250°C, FID 280°C, gás de arraste hidrogênio, fluxo da coluna de 1mL / min e “split” de 1:100).

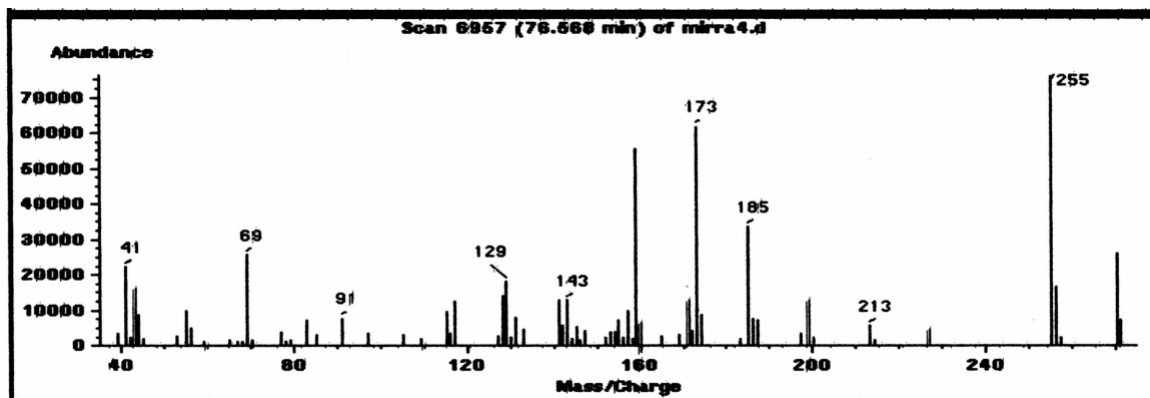


Cromatograma 9: CIT expandido da 4ª e última região do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd.(obtido por coação). Condições de análise: coluna polar (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1ml / min., “split” de 1:100) e o espectro de massas do abietadieno leitura de varredura 6790.

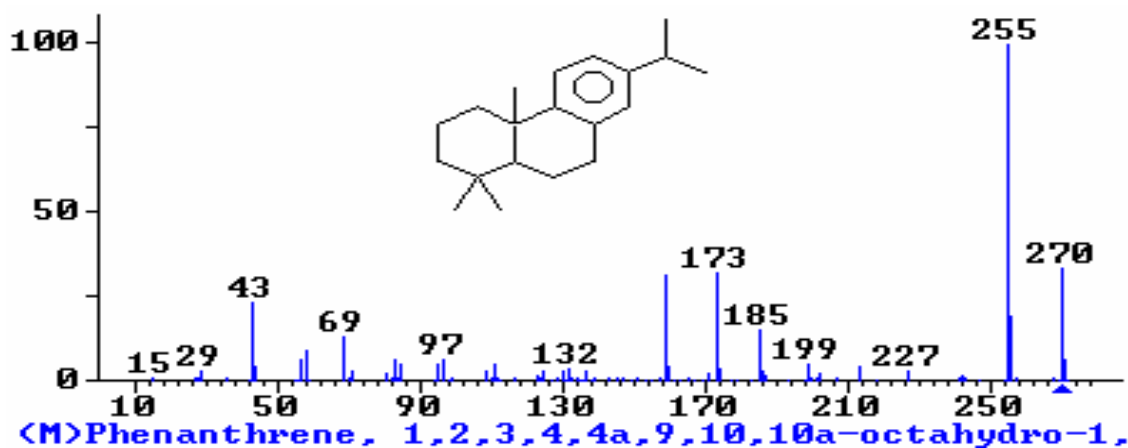
DB5-2891 KI-2080 ABIETADIENE
 CAS#35241-40-8 MF C20 H32 FW 272 L0577
 CN Phenanthrene, 1,2,3,4,4a,4b,5,6,10,10a-decahydro-1,1,4a-trimethyl-7-(1-methylethyl)-, [4aS-(4a.alpha.,4b.beta.,10a.beta.)]- (9CI)
 SYNONYMS: Abieta-7,13-diene.



Espectro 3: E.M. do abietadieno obtido na literatura (Adams, 1995)



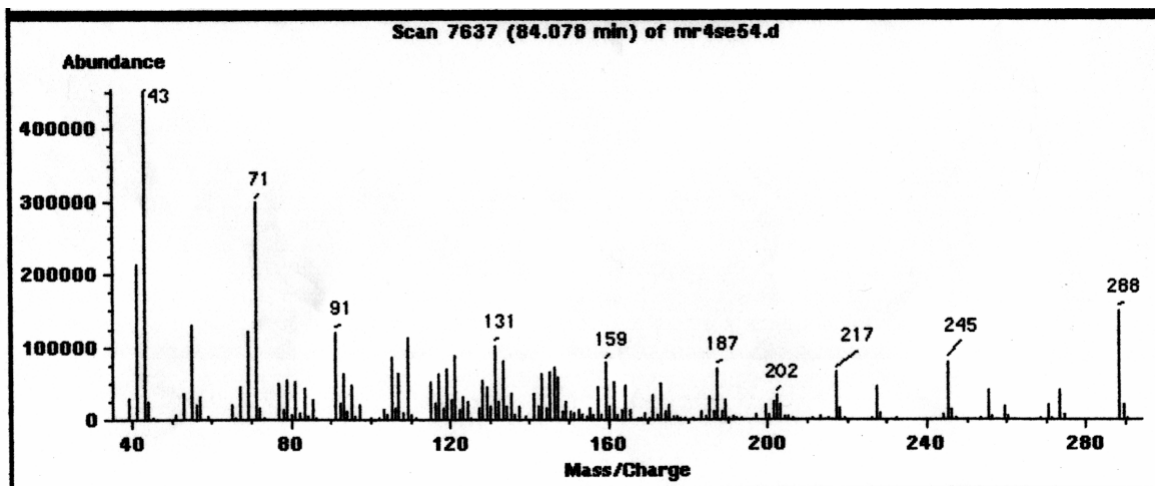
Espectro 4: E.M. do abietatrieno, obtido do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (obtido por coação). Condições de análise: coluna polar (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1ml / min., “split” de 1:100), e a leitura de varredura 6867.



Espectro 5: E.M. do Abietatrieno, obtido na espectroteca “NIST”.

Com o peso molecular da substância obtidos de óleos essenciais e a região em que ela se encontra no cromatograma, podemos tentar encontrar sua fórmula molecular e calcular o número de insaturações (Sylverstein, 1994).

O pico mais intenso na 4ª região, dos diterpenos, (t_R 90,356 minutos) apresenta um espectro de massas (Espectro 6, p.33) com íon molecular $m/z = 288$ e 16 u. m. a. maior que o abietadieno $m/z = 272$ (Espectro 4, p.32). Sugerindo a estrutura do abietadieno com mais um oxigênio. Sua fórmula molecular é $C_{20}H_{32}O$ com 5 insaturações.



Espectro 6: E.M. do t_R 90,356min., obtido do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Cood. (obtido por cooabação). Condições de análise: coluna polar (polietileno glicol, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-220°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 40 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1ml / min., “split” de 1:100) e a leitura de varredura 7637.

Como já foi visto anteriormente pelos trabalhos de (Duarte, 1997; Torquilha, 1996; Martins, 1998; Luciana 1998, e Porte, 1999), feitos com o do Dr. Ronoel, a principal dificuldade encontrada no estudo do óleo essencial em coluna polar é a confiabilidade dos resultados. Quando comparamos os índices de retenção obtidos com os encontrados na literatura.

Essas dificuldades vem sendo observadas na literatura, (relatadas e descritas) em vários trabalhos (Committe, 1978; 1980; 1981; 1984; 1987; 1988; 1990, 1997).

Num trabalho inicial foi formado um “Sub-Committe” o qual estabeleceu que a falta de repetibilidade dos índices de retenção está relacionado a falta de reprodutibilidade das fases estacionárias das colunas cromatográficas, ocasionando problemas na obtenção da uniformidade dos resultados quando usamos a impressão digital (“fingerprint”) de óleos essenciais em temperatura programada. Logo, era necessário padronizar a eficiência das colunas e suas seletividades, sem usar uma como fator da outra (Committe, 1997).

Usando índice de retenção relativo da mistura de seis substâncias e aplicando a essa mistura uma série de cálculos matemáticos, Dool (1974), obteve um fator de polaridade “g-pack”. Este valor varia com os diferentes tipos de fases estacionárias e sua condições.

Baseado no trabalho de Dool, o “sub-committe”, definiu uma metodologia a ser usada para obtenção da reprodutibilidade, impressão digital, dos óleos essenciais em coluna de fase estacionária polar e baixa polaridade em temperatura programada. Durante esses estudos concluíram que o valor do “g-pack” não varia com as mudanças dos parâmetros operacionais, varia com o decorrer do tempo de uso das colunas, fornecendo uma boa indicação de suas condições.

Assim o “Sub-Committe” estabeleceu que quando se trabalha com coluna empacotada que ela seja feita no próprio laboratório, para um controle maior da fase estacionária, ou no caso de coluna capilar que seja fabricada nas mesmas condições.

O que se observa, no entanto, na maioria dos trabalhos envolvendo o uso de índice de retenção em análises de óleos essenciais é que não é citada a ordem de eluição dos constituintes em coluna de fase estacionária polar, sendo por isso mais utilizada a coluna não polar.

Em resumo, devido as dificuldades encontradas e relatadas na literatura, dos 88 picos do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. e seus respectivos espectros de massas, somente 22 foram identificadas corretamente. Dentre eles temos: α -pineno IR 1033 (1,49%), canfeno IR 1076 (1,0%), β -pineno IR 1177 (0,91%), sabineno IR 1130 (1,47%), α -felandreno IR 1173 (0,22%), α -terpineno IR 1186 (0,21%), limoneno IR 1204 (1,29%), β -(Z)-ocimeno IR 1229 (0,26%), γ -terpineno IR 1247 (0,38%), α -copaeno IR 1495 (0,26%), α (E)-bergamoteno IR 1585 (0,35%), (Z)-cariofileno IR 1592 (5,51%), α -humuleno IR 1662 (0,26%), borneol IR 1714 (1,52%), α -muuroleno IR 1729 (0,72%), biciclogermacreno IR 1744 (2,38%), δ -cadineno IR 1791 (5,09%), espatulenol IR 2125 (0,24%), EPI- α -cadinol IR 2136 (1,29%), EPI- α -muurolol IR 2140 (1,32%), α -muurolol IR 2198 (1,92%) e o α -cadinol IR 2248 (0,29%), o que corresponde a 25% da composição do óleo.

Pelos motivos descritos acima, resolvemos trabalhar apenas com a coluna de fase estacionária baixa polaridade (HP-5).

**ANÁLISE DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE
TETRADENIA RIPARIA HOCHSTETTER CODD. EXTRAÍDO POR
COOBAÇÃO E ANALISADO EM COLUNA DE CROMATOGRAFIA GASOSA
5% DIFENIL, 95% DIMETILPOLISILOXANO (HP-5)**

O estudo do óleo essencial em coluna de fase estacionária baixa polaridade 5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano (HP-5) vem sendo cada vez mais utilizado, uma vez que ocorre maior reprodutibilidade dos índices de retenção.

A literatura mostra diversas listas de ordem de eluição obtidas em colunas com fase estacionária não polar e de fabricantes diferentes, o que permite maior confiabilidade nos resultados de comparação de índice de retenção.

Nesta fase do trabalho o óleo essencial obtido por coobação das folhas de mirra foi analisado em coluna de fase estacionária 5% fenil, 95% metilpolisiloxano (Cromatograma 10, p.36). O índice de retenção relativo foi feito injetando-se padrões de *n*-alcanos C₇ a C₂₇, separada e concomitantemente.

A co-injeção nos fornece maior confiabilidade dos resultados, entretanto temos que tomar cuidado com a sobreposição de picos. Em nosso trabalho o hidrocarboneto C₁₄ está co-eluinto com o monoterpeno cipereno, o C₁₅ co-elui com o sesquiterpeno biciclogermacreno e o C₁₇ co-elui com um pico não identificado (Cromatograma 13, p. 39). Por este motivo utilizamos as duas técnicas para obtermos os índice de retenção relativo dos constituintes voláteis do óleo essencial de mirra: injeção dos padrões, e injeção do óleo com os padrões.

Tomou-se cuidado para que as concentrações dos hidrocarbonetos não ultrapassassem a escala superior do integrador. Isso porque verificamos alteração nos tempos de retenção e consequentemente no índice de retenção relativo, quando o pico está muito concentrado (estourado).

Assim obtivemos os índice de retenção relativo de todos os picos integrados (Tabela 7, p.91-97) adquiridos por cromatografia gasosa de alta resolução utilizando seguinte fórmula:

$$IR = \left(\frac{\log t_{R, subst} - \log t_{R, n}}{\log t_{R, n+1} - \log t_{R, n}} + n \right) \times 100$$

IR = Índice de retenção.

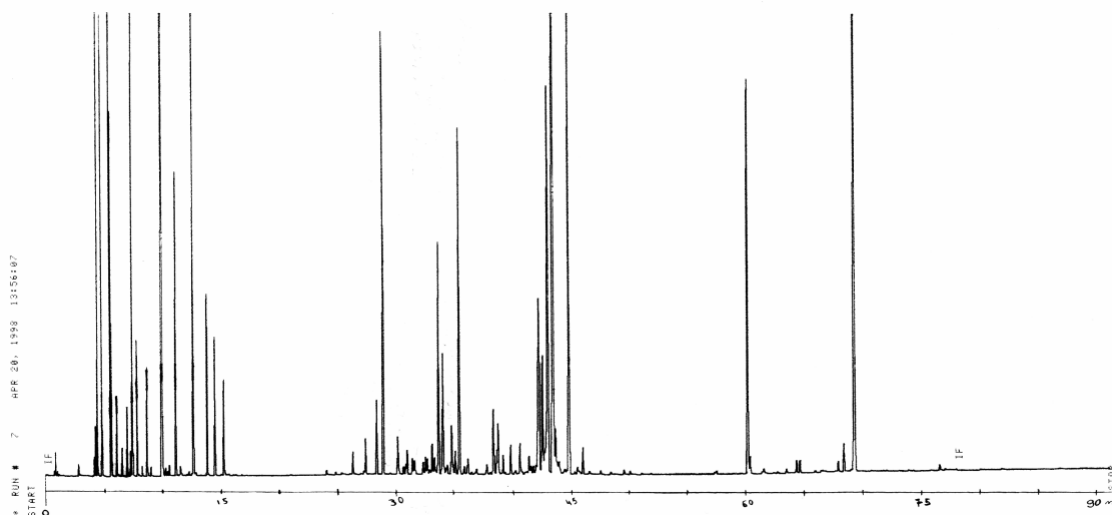
$\log t_{R, subst}$ = Logaritmo do tempo de retenção ajustado da substância (amostra).

$\log t_{R, n+1}$, $\log t_{R, n}$ = Logaritmo do tempo de retenção ajustado dos padrões posteriores e anteriores da série homóloga.

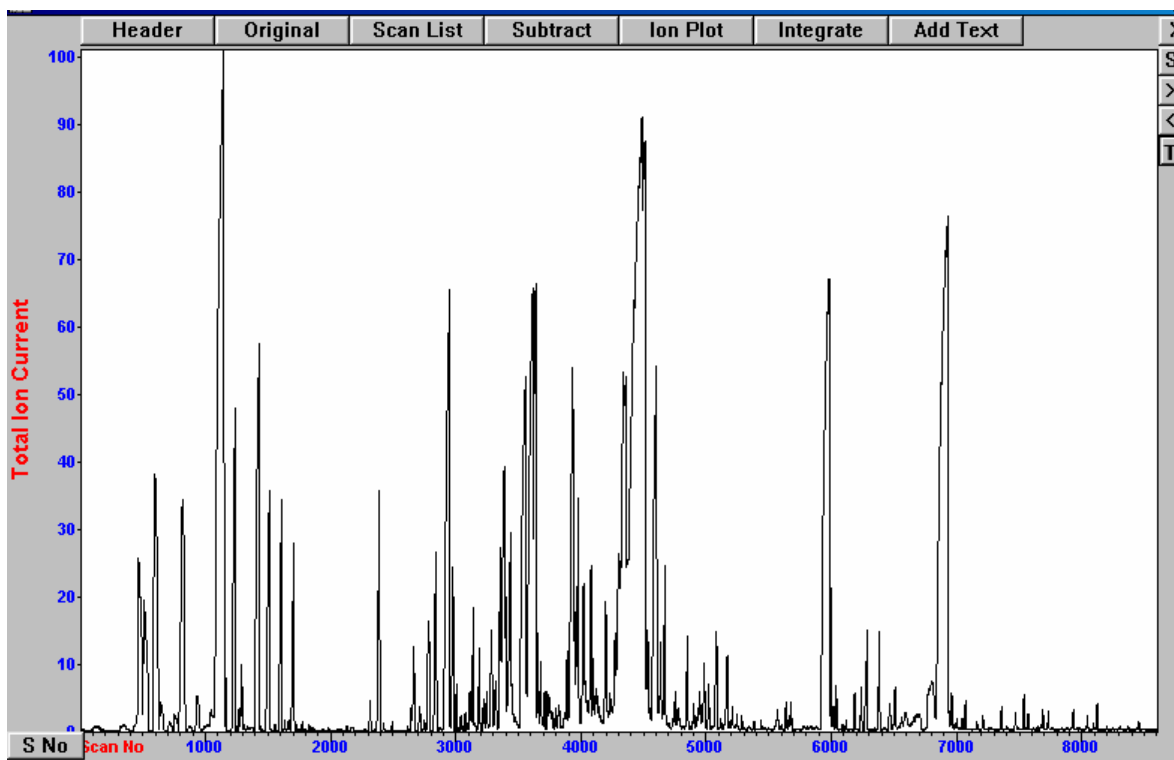
$t_{R,}$ = Tempo de retenção ajustado da amostra, obtido pela diferença do tempo de retenção da amostra – tempo de retenção do gás butano.

100 = Intervalo entre os números de átomos de carbono dos padrões de *n*-alcanos.

Para identificação da composição química do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. fez-se também a análise por CG-DSM em coluna não polar (HP-5) e adquiriu-se 88 bons espectros de massas no programa “WSEARCH” (Cromatograma 11, p.37). Desse total conseguimos identificar 66 constituintes (Torquillo, 1999).



Cromatograma 10: CGAR do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (obtido por coobação). Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, FID 280°C, gás de arraste hidrogênio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100).

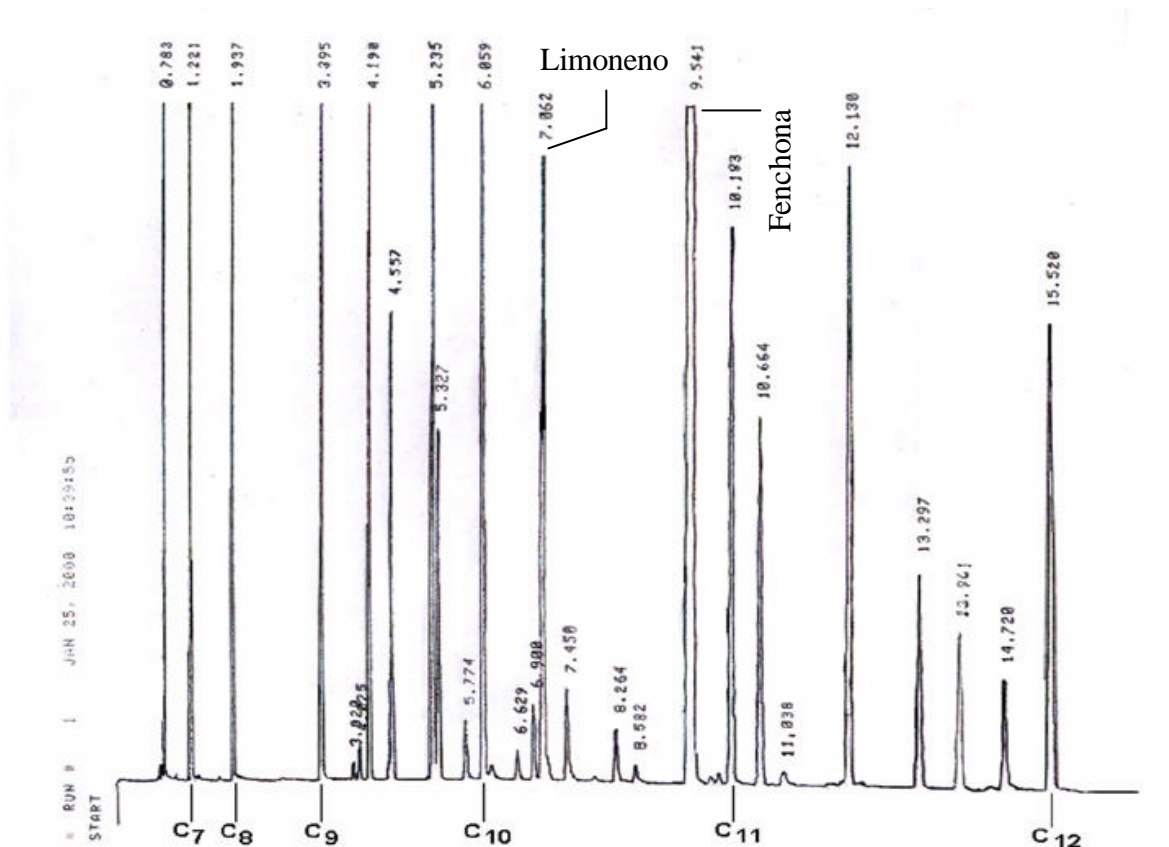


Cromatograma 11: CIT do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (obtido por coobação). Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100).

Para uma melhor interpretação dos dados obtidos neste trabalho dividimos o cromatograma-10 (p.36) e o cromatograma-11 do óleo essencial de mirra, em intervalos de tempos de retenção.

Os componentes identificados em coluna não polar (HP-5) do óleo essencial de mirra encontram-se na tabela-7, p.91-97), com seus respectivos índices de retenção relativos e suas percentagens.

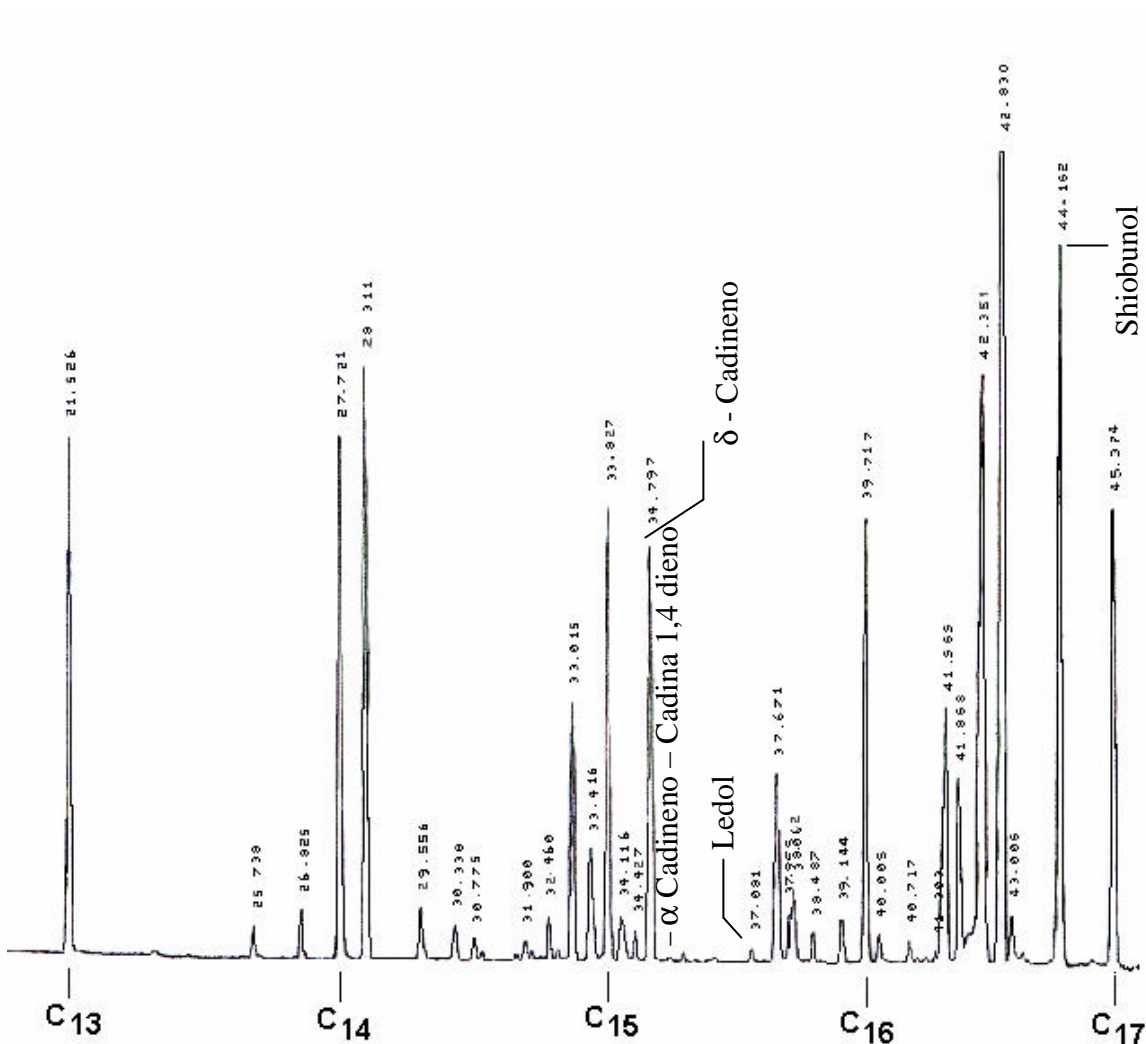
No intervalo de tempo de retenção (t_R 1,221 a 15,512 min.) 26 constituintes foram identificados (Tabela 7, p. 91-92), correspondendo a 47,34% do óleo estudado (Cromatograma 12, p. 38). Dentre esses constituintes temos 15 monoterpenos hidrocarbonetos e 10 oxigenados (1 cetona, 8 álcoois, 1 aldeído), sendo a fenchona o monoterpeno predominante com 23,7% de teor.



Cromatograma 12: CGAR do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (obtido por cooção), com os padrões C₇ a C₁₂ co-injetados. Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μm, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, FID 280°C, gás de arraste hidrogênio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100).

Com os espectros de massas e a seqüência dos índices de retenção relativo, identificamos no intervalo de tempo de retenção (t_R 21,986 a 45,574 min.) um total de 38 substâncias representando 34,79% da composição do óleo essencial de mirra (Cromatograma 13, p.39).

Nesta região, temos 25 sesquiterpenos hidrocarbonetos e 15 sesquiterpenos oxigenados (14 álcoois e 1 cetona).



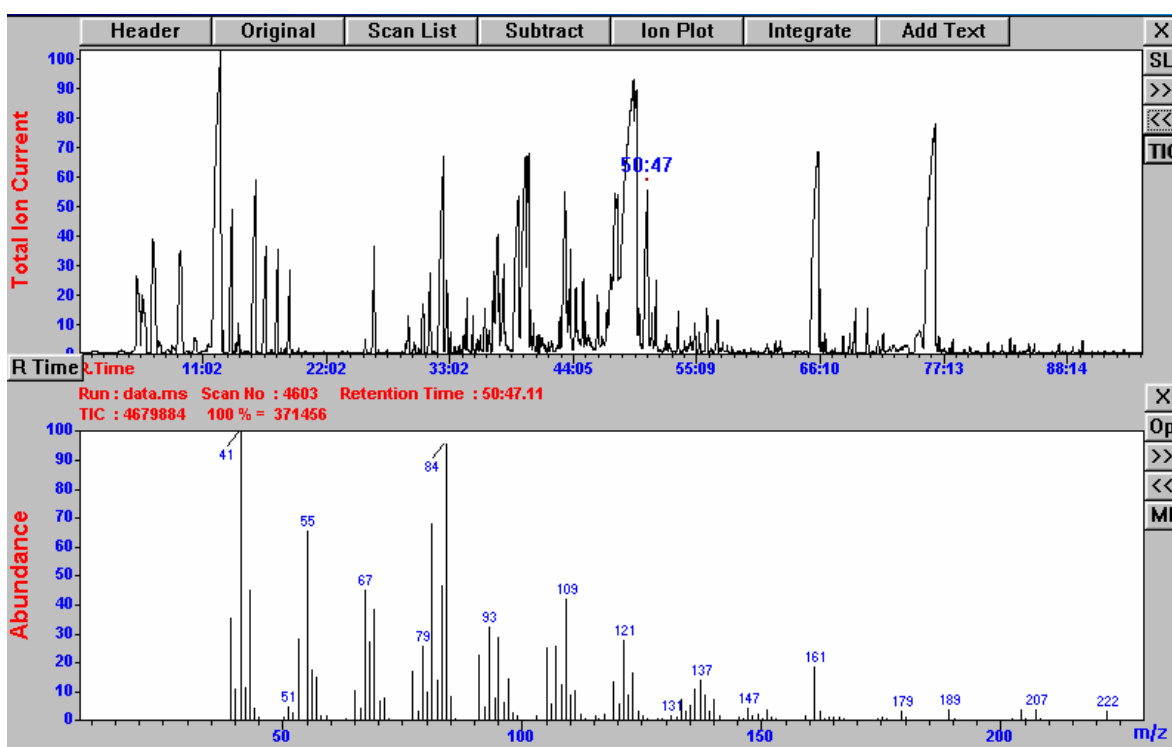
Cromatograma 13: Continuação do CGAR do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (obtido por cooção), com os padrões C₁₃ a C₁₇ co-injetados. Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, FID 280°C, gás de arraste hidrogênio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100).

Após a interpretação dos espectros de massas observamos que não havíamos encontrado o sesquiterpeno oxigenado shiobunol, o qual localizamos no estudo da coluna de fase estacionária polar (HP-FFAP), (Cromatograma 7, p.27).

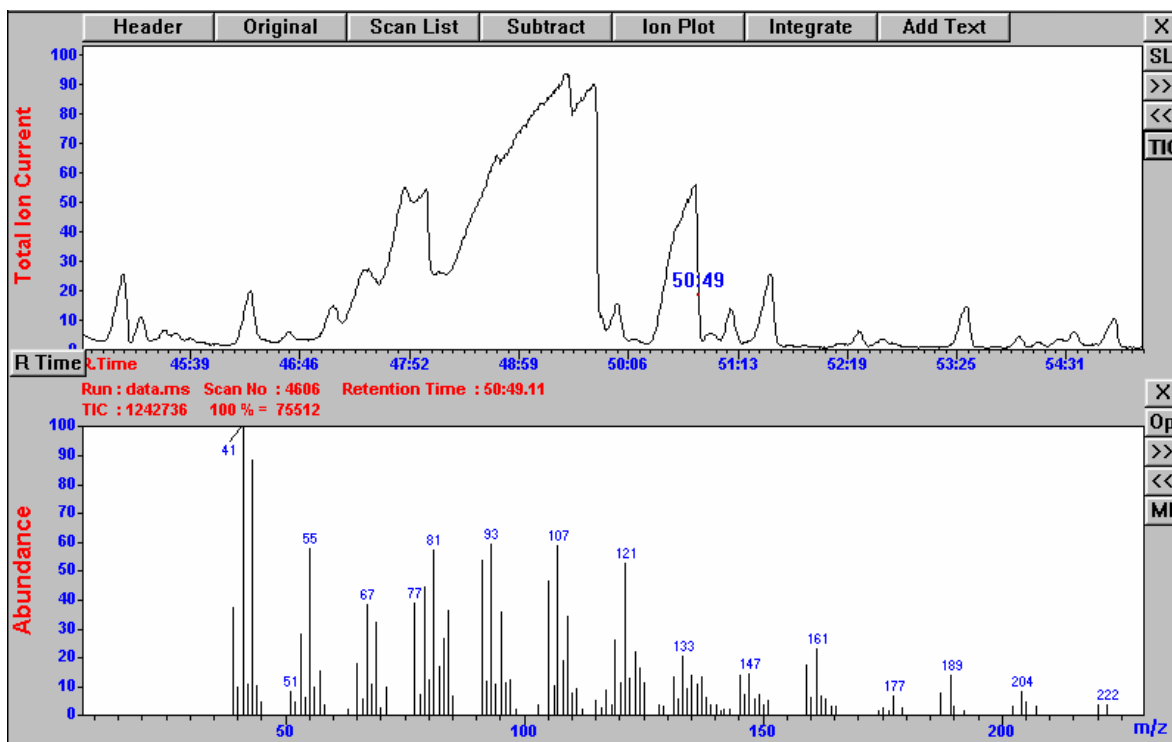
Observamos que a separação dos sesquiterpenos por CGAR-DSM não foi muito boa. Esse fato em alguns casos ocorre devido a altas concentrações das substâncias nessa região, e principalmente pelo sistema de vácuo do CGAR-DSM. Para resolver esse problema teríamos que trabalhar com restrição do vácuo na interface do sistema, o que não foi possível. Isso explica não termos achado o espectro de massas do shiobunol em coluna de fase estacionária não polar (HP-5). Procuramos então, minuciosamente, na região dos sesquiterpenos, um espectro de massas com as mesmas

fragmentações do espectro de massas do shiobunol como na coluna polar (HP-FFAP) (Cromatograma 7, p.27) e o fornecido pela espectroteca NIST (Espectro 2, p.28).

Assim destacamos o espectro de massas do pico de tempo de retenção 50,47 min, por possuir íons moleculares $m/z = 81$, $m/z = 121$ e $m/z = 161$. Entretanto, como podemos observar, esse espectro de massas apresenta, além dos íons mencionados acima, o íon a $m/z = 84$ (cromatograma 14, p. 40) o qual não aparece no espectro que estamos utilizando como referência (Cromatograma 7, p.27). Ao caminharmos com o cursor para alguns minutos adiante encontramos o espectro de massas do shiobunol (Cromatograma 15, p. 41). Sugerindo assim que o shiobunol está misturado com outro composto (co-eluído). Como não temos dados na literatura sobre este constituinte para confirmarmos seu índice de retenção, não podemos identificá-lo. Por este motivo o shiobunol não encontra-se listado em nossa tabela de constituintes do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd.



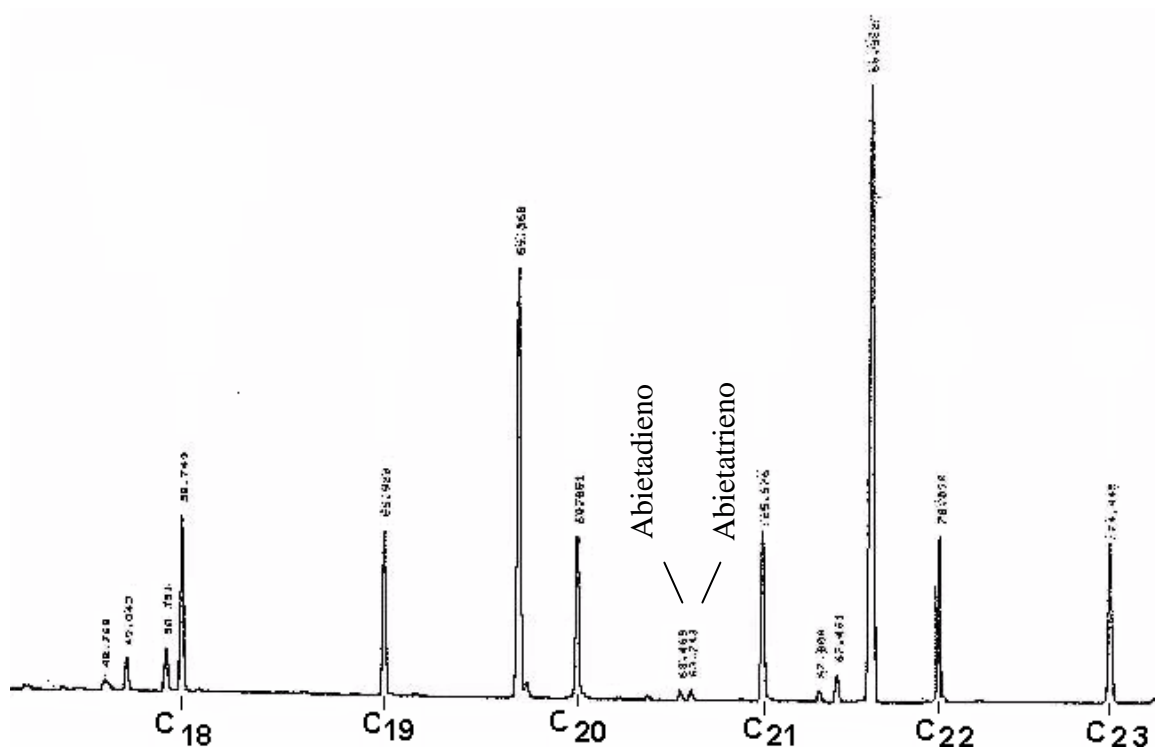
Cromatograma 14: CIT do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (obtido por coabação). Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μm , 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1 mL / min, “split” de 1:100) e o espectro de massas do pico com t_R 50,47 min. leitura de varredura 4603.



Cromatograma 15 CIT expandido do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, DSM 300°C, hélio, 1mL / min, “split” de 1:100) e o espectro de massas do pico com t_R 50,49 min., leitura de varredura 4606.

Na terceira e última região do t_R 48,760 a t_R 79,469min.(cromatograma 16, p.42), temos apenas dois diterpenos identificados por seus espectros de massas e seus índices de retenção, o abietatrieno com teor de 0,04% e o abietadieno 0,38%, confirmando o resultado da análise por coluna HP-FFAP. (Cromatograma 9, p.31 e Espectro-3, p. 31).

Os picos encontrados no intervalo de tempo de retenção acima do *n*-alcano C₁₉ apresentam espectros de massas com peso molecular de diterpenos e correspondem a 7,79 % da composição química do óleo essencial de mirra. Os picos de t_R 64,563 e t_R 68,526 são bem significativos com 7,16 % de teor, porém não foram identificados por falta de dados na literatura (Cromatograma 16, p.42).



Cromatograma 16: Continuação do CGAR do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (obtido por coação), com os padrões C₁₈ a C₂₃ co-injetado. Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μm, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, FID 300°C, gás de arraste hidrogênio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100).

Até o momento tivemos um total de 66 picos identificados que representam 77% da composição química do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd.

A dificuldade de identificar todos os constituintes de misturas complexas é comum para os pesquisadores de óleos essenciais, alguns óleos essenciais fornecem em média 150 picos e nem todos os constituintes são identificados com os recursos relatados na literatura e neste trabalho.

ANÁLISE DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS, EXTRAÍDOS DE UMA FOLHA DA ESPÉCIE *TETRADENIA RIPARIA* HOCHSTETTER CODD., POR MICRO-EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA COM E SEM AQUECIMENTO.

Partindo do princípio de que a micro-extração em fase sólida (MEFS) é uma técnica de fácil manuseio, rápida e ideal para misturas complexas de compostos orgânicos voláteis, podendo ser feita com injeção manual ou automática em cromatógrafo gasoso acoplado com detetor seletivo de massas (Fennema 1997), fizemos análise do óleo essencial de uma folha seca de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd.

O objetivo de usar a MEFS foi de tornar a análise dos constituintes voláteis de óleo essencial mais rápida, porém com a mesma eficiência que extraídos pelos métodos convencionais.

Sem parâmetros na literatura para o uso da técnica de MEFS em óleo essencial, tivemos que estabelecer principalmente, as condições de temperatura, tempo de adsorção e quantidade de material vegetal. Fixamos a temperatura de 100° C, a mesma utilizada para extração de óleo essencial por hidrodestilação. Variamos em 10, 5 e 3 minutos o tempo de adsorção na seringa, de uma folha seca num frasco (selado) de 20mL.

A análise destes 3 experimentos após 10 minutos de dessorção térmica em CG-DSM, mostrou que não houve alteração no perfil cromatográfico (área dos picos). Assim decidimos trabalhar com o menor tempo (3 min) de adsorção na fibra.

Um outro experimento foi a adsorção na seringa (injetor automático), dos constituintes voláteis de uma folha seca num frasco de 2mL sem aquecimento durante 30 minutos. Para este experimento a dessorção térmica (10 min) em CG-DSM, foi feita por injeção automática.

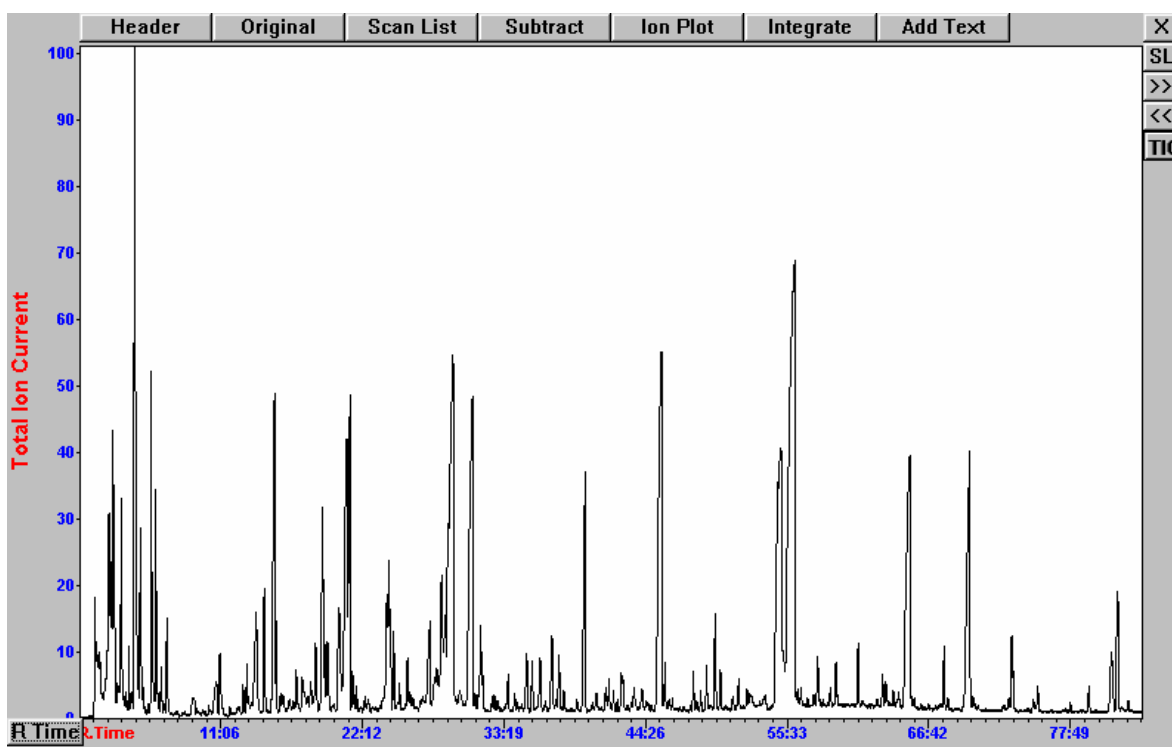
Na análise comparativa dos cromatogramas de íons totais do óleo essencial obtido pela técnica de MEFS à quente por 3 min (Cromatograma 17, p.45) e a frio (Cromatograma 18, p.46) da espécie estudada neste trabalho, observamos uma maior quantidade de picos na técnica de MEFS a quente (100°C), chegando a misturar as regiões dos sesquiterpenos e diterpenos, tal qual a cooção (Cromatograma 11, p.37). Na técnica de MEFS sem aquecimento observamos uma menor quantidade de constituintes extraídos.

Apesar das poucas variáveis trabalhadas concluímos que para uma boa extração do óleo essencial de mirra por MEFS necessitamos de apenas 3 min de adsorção a 100°C e uma folha do material vegetal.

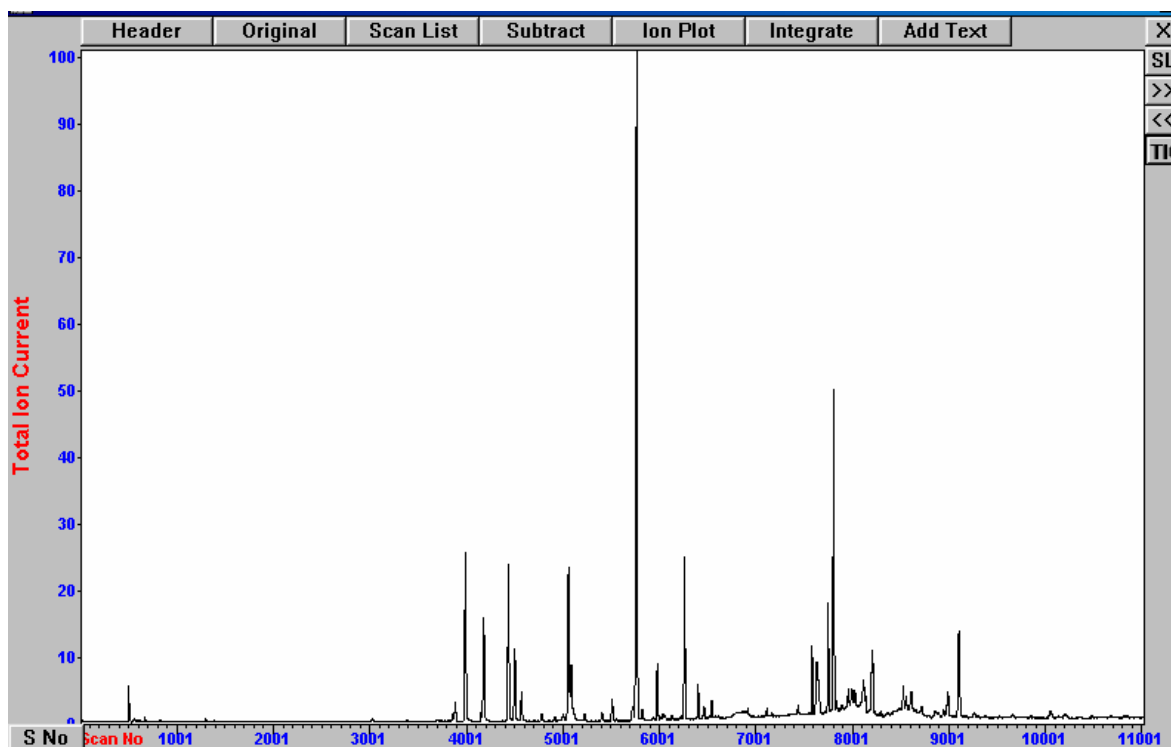
Na análise comparativa da técnica de MEFS dos constituintes voláteis do óleo essencial de mirra, com a técnica de extração de óleo essencial por cooção, observamos algumas vantagens e desvantagens que estão apresentadas na Tabela 5, (p.44).

Tabela 5: Análise comparativa da técnica de microextração em fase sólida e a técnica de extração por cooção.

EXTRAÇÃO POR COOBAÇÃO	EXTRAÇÃO POR MEFS
<p data-bbox="443 398 654 439" style="text-align: center;">VANTAGENS</p> <ol data-bbox="272 481 823 584" style="list-style-type: none"> 1. Obtenção do óleo essencial para análises futuras (densidade, índice de refração, etc.) e outros usos. <p data-bbox="411 801 683 842" style="text-align: center;">DESVANTAGENS</p> <ol data-bbox="272 884 823 1171" style="list-style-type: none"> 1. Aquecimento com água (possível oxidação). 2. Tempo de extração (de 4 horas até 18 horas). 3. Grande quantidade de matéria prima (cerca de 1Kg). 4. Possível perda dos componentes mais voláteis (monoterpenos). 	<p data-bbox="1015 398 1225 439" style="text-align: center;">VANTAGENS</p> <ol data-bbox="839 481 1401 734" style="list-style-type: none"> 1. Quantidade pequena de Matéria Prima (1 a 2 folhas). 2. Tempo de extração reduzido 3. Não há perdas dos constituintes mais voláteis. 4. Cromatograma sem pico de solvente. 5. Sem formação de artefatos. <p data-bbox="986 801 1257 842" style="text-align: center;">DESVANTAGENS</p> <ol data-bbox="839 884 1401 987" style="list-style-type: none"> 1. Não obtenção do óleo essencial para análises futuras (análises físico-químicas e farmacológicas).



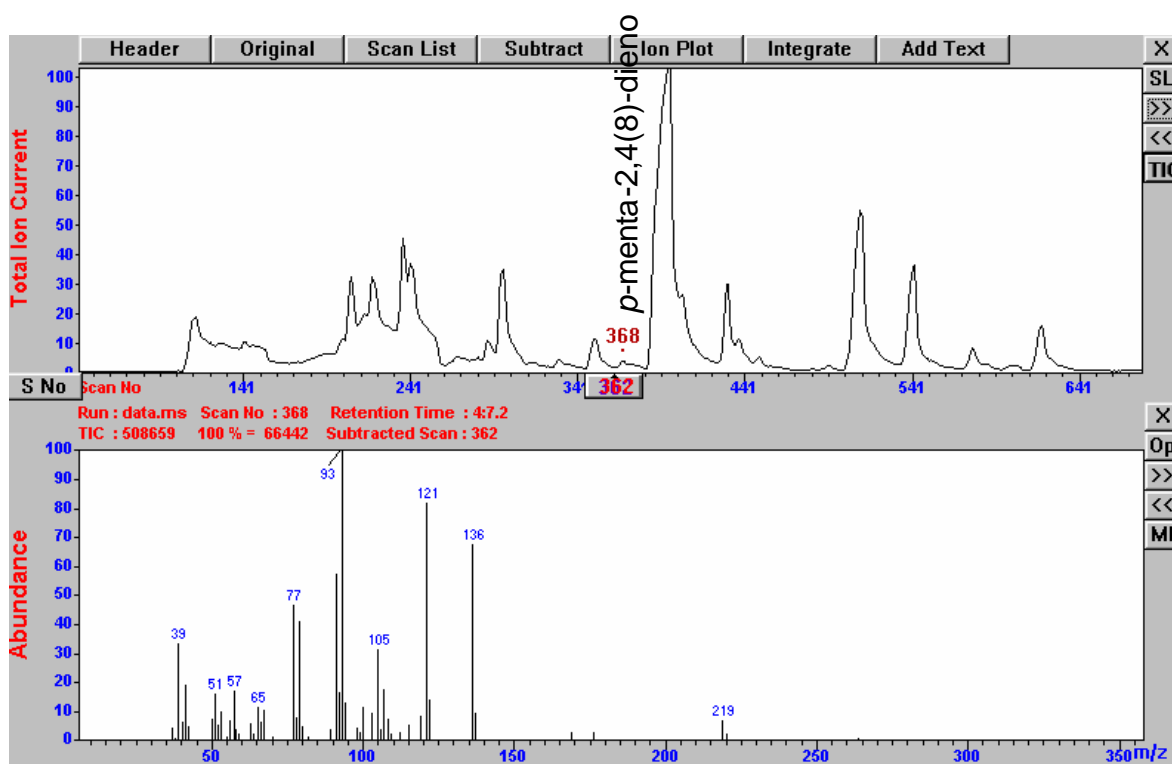
Cromatograma 17: CIT do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (extraído por MEFS com aquecimento), injeção manual em CGAR-DSM. Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μm , 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1 mL / min, “split” de 1:100).



Cromatograma 18: CIT do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd., (extraído por MEFS sem aquecimento). Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μm , 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, DSM 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100).

Quando expandimos o cromatograma de íons totais, obtido pela técnica de MEFS com aquecimento, do tempo de retenção de 1,00 a 11,00 minutos (Cromatograma 19, p.47), identificamos mais 2 monoterpenos, o α -fencheno, e o *p*-menta-2,4,(8) dieno, (identificados na Tabela 7, p.92) sendo confirmados pela MEFS sem aquecimento. Já no óleo essencial extraído por coação e analisado por CGAR-DSM não os identificamos devido estarem em quantidades muito pequenas (Cromatograma 12, p.38) e seus espectros de massas não estarem bem resolvidos, por outro lado na MEFS o espectro de massas do *p*-menta-2,4(8)-dieno está bem nítido (Cromatograma 19, p.47). Através da comparação automática do espectro de massas da espectroteca “NIST” (Espectro 7, p.48) e a seqüência da ordem de eluição do índice de retenção confirmamos este monoterpeno.

A pouca diferença entre o espectro de massas obtida pela comparação automática do espectro de massas do *p*-menta-2,4(8)-dieno com o espectro de massas da espectroteca “NIST”, conforme mostra a Figura 6 (p.48), ajuda na identificação através da comparação visual.



Cromatograma 19 CIT expandido do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (extraído por MEFS sem aquecimento). Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, FID 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100), e o espectro de massas do *p*-menta-2,4(8)-diene.

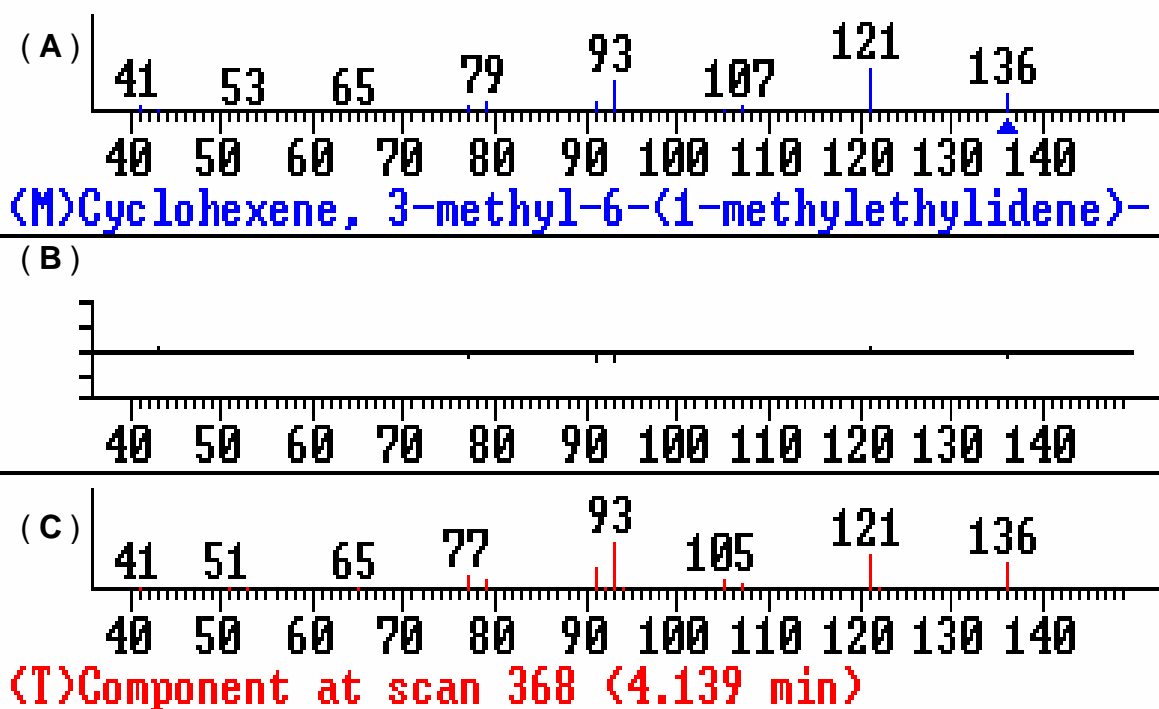
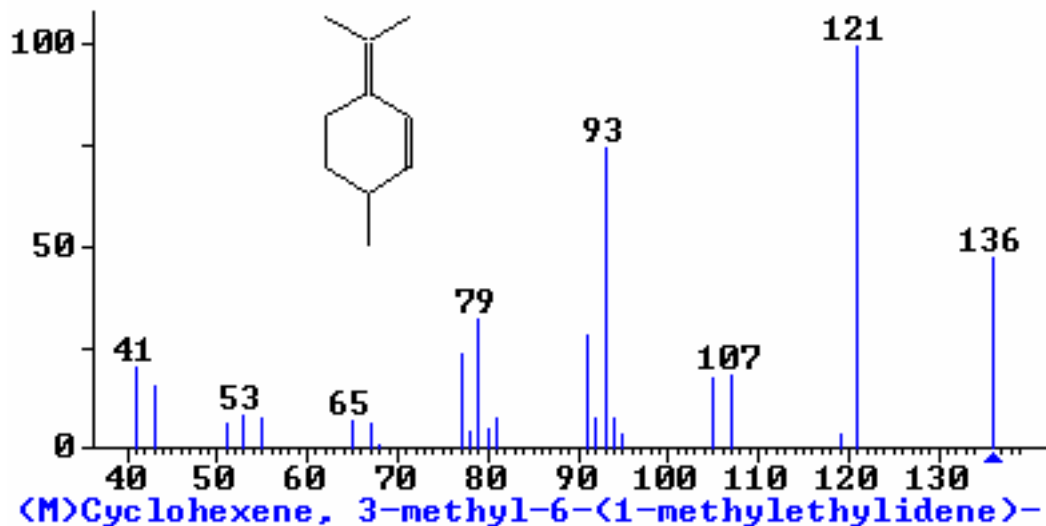


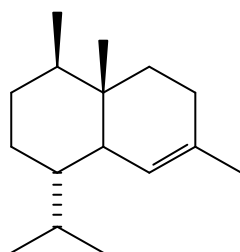
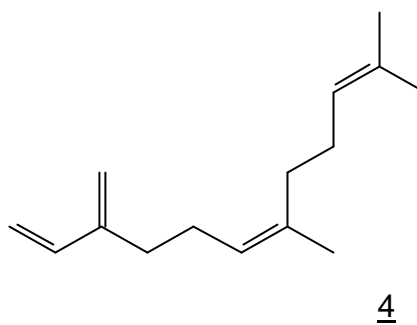
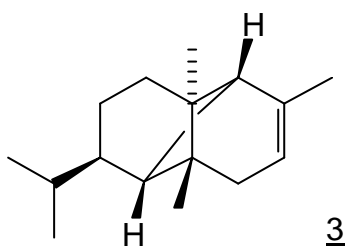
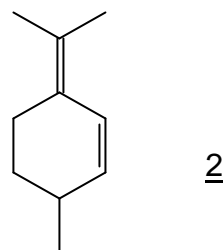
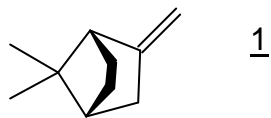
Figura 6: Resultado da comparação automática fornecida pela espectroteca “NIST”. Onde (A) é o espectro de massas obtido, (B) é a diferença entre o espectro de massas obtido e o da espectroteca “NIST”, (C) é o espectro de massas da espectroteca “NIST”.



Espectro 7: E.M. do *p*-menta-2,4(8)-dieno, obtido na espectroteca “NIST”.

Neste trabalho obtivemos mais cinco constituintes identificados no óleo essencial estudado, α -fencheno 1, *p*-menta-2,4(8)-dieno 2, α -copaeno 3, β -(E)-farneseno 4 e o cubenol 5, aumentado para 71 o número de constituintes identificados. Esses terpenos não foram identificados na análise por coabação o que nós concluímos

que na hidrodestilação pode ter havido perdas, e que a adsorção mostrou-se eficiente para compostos com baixa concentração.



O resultado desta análise foi satisfatório mesmo fornecendo apenas mais cinco substâncias, pois atingimos o objetivo de reduzir o tempo de análise e a quantidade de material vegetal.

IDENTIFICAÇÃO AUTOMÁTICA DE DECONVOLUÇÃO DE ESPECTROS DE MASSAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *TETRADENIA RIPARIA* HOCHSTETTER COOD. EXTRAÍDO POR COOBAÇÃO E MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA COM AQUECIMENTO.

O equipamento utilizado neste trabalho, para as análises cromatográficas é um modelo CG/DSM 5890/5970, controlado por um microcomputador HP série 9000, cujo sistema operacional é HP-UX série 9000, o qual não permite a utilização do programa "AMDIS", bem como do programa de busca automática da "NIST". Assim todos os dados adquiridos pelo HP 9000 foram transferidos por protocolo de transferência de arquivos (FTP) para um microcomputador com sistema operacional "Windows" 98, compatível com os programas "AMDIS" e de buscas "NIST".

O programa "AMDIS", é um programa que implementa o método de **deconvolução** e identificação automática de espectros de massas. Tem a capacidade de ler diretamente os arquivos de dados de espectros de massas oriundos de equipamentos como HP, o que permitiu a análise dos mesmos sem que se utilizasse qualquer conversor de dados.

Buscando agilizar e aumentar o número de picos identificados no óleo essencial estudado, utilizamos o sistema automático de deconvolução e identificação de espectros adquirido no mercado.

Os parâmetros de identificação na análise de deconvolução de espectros, neste trabalho, foram escolhidos através da caixa de diálogo do programa para uma melhor resposta dos resultados. Portanto, o fator de "match" mínimo inicial foi de 80 (padrão do programa), variável conforme o resultado obtido e com a intensidade dos sinais. A faixa de varredura utilizada na aquisição dos dados foi estabelecida de 40 à 400 *m/z*. No limite mínimo de sinal registrado pelo equipamento, utilizamos o modo baixo para permitir trabalhar com um maior número de dados.

Como parâmetros de deconvolução, escolhemos a largura do componente em 8 varreduras, subtração de dois picos vizinhos, alta resolução e altíssima sensibilidade.

As análises de deconvolução foram realizadas para o método de extração por coobação e para o método de micro-extração em fase sólida com aquecimento (3 min.). Os resultados obtidos na deconvolução confirmaram as substâncias já identificadas e acrescentaram mais 39 (Tabela 7, p.71-72).

O cromatograma de íons totais expandido, obtido em coluna não polar (HP-5) do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Cood. obtido por coobação (Cromatograma 20, p.52), apresentou no tempo de retenção (9,01 min.) um pico único identificado através da busca automática da espectroteca "NIST" (Espectro 8, p.52) e "Wiley" como limoneno, porém apresenta um "match" baixo (53%).

Quando analisamos um pico obtido pelo CGAR-DSM procuramos seu melhor espectro, que quase sempre está no ápice do pico. Deixamos de lado o que chamamos de interferentes (ruídos eletrônicos, sangramento de coluna, etc.), mas nem sempre

esses interferentes são ruídos, podem ser picos co-eluídos ou picos com tempo de retenção muito próximo ao da substância analisada.

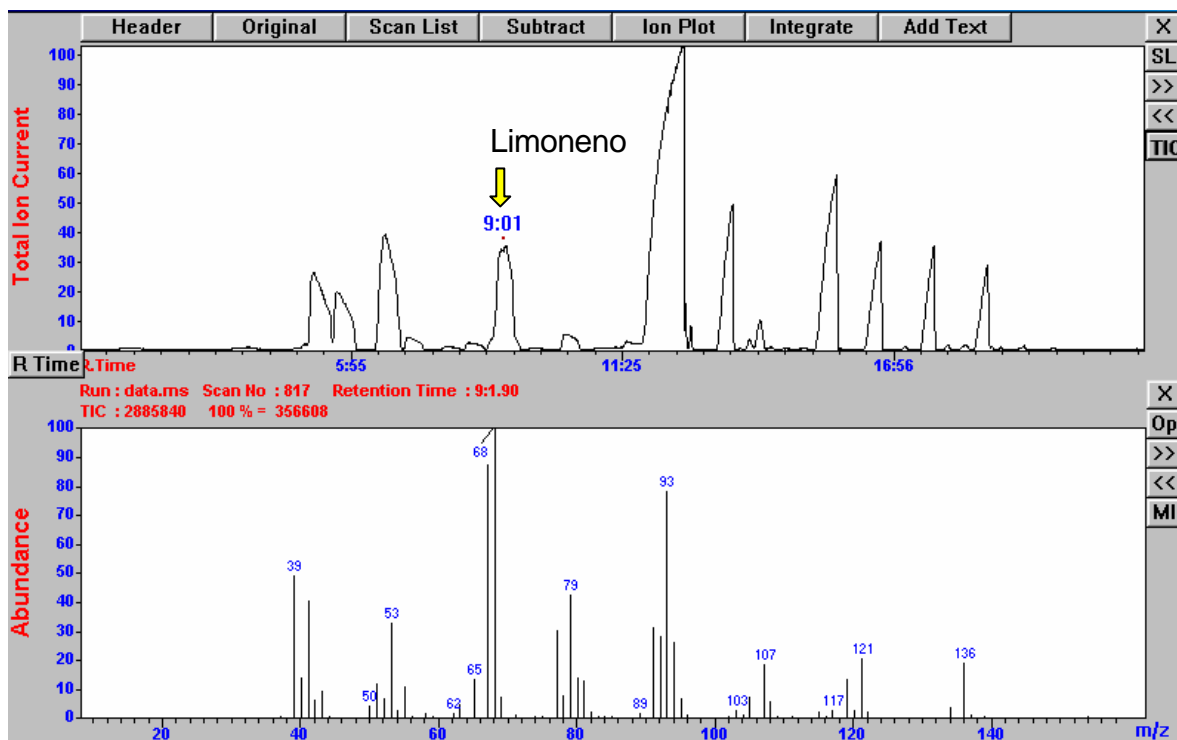
Em uma primeira análise na estação de dados do DSM 5790 e depois utilizando o programa “Wsearch” tivemos alguns exemplos do problema citado acima.

O “Wsearch” reproduz o programa da estação de dados que trabalhamos no espectrômetro de massas MSD 5790. Utilizando os mesmos recursos de busca automática em espectrotecas “PBM”. A grande vantagem do “Wsearch” é de que o pesquisador pode trabalhar os espectros de massas em qualquer computador, desocupando o operador (técnico responsável pela análise), o computador do aparelho e retirando ele mesmo os resultados que melhor lhe convier.

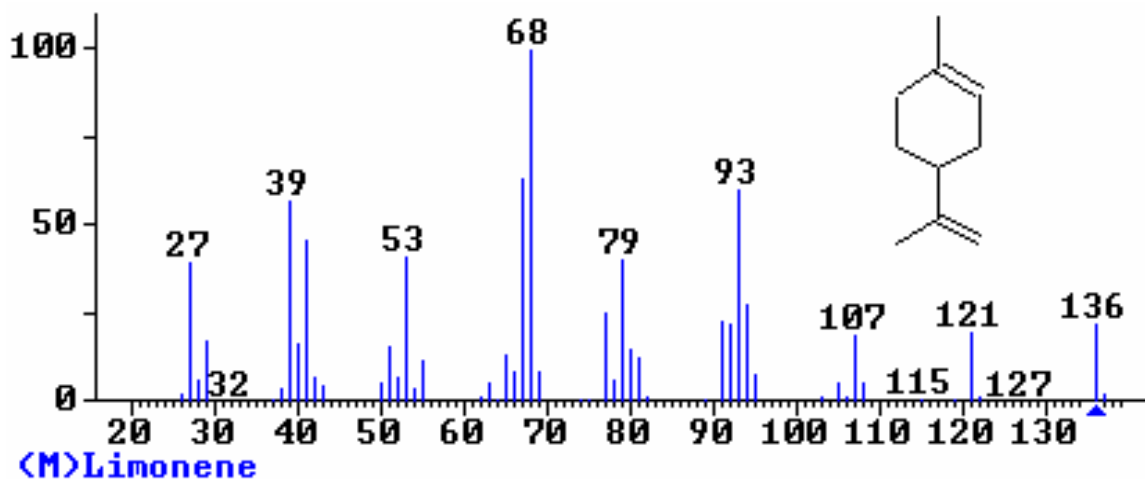
A literatura mostra que em coluna não polar, o monoterpeno limoneno sai junto com o *p*-cimeno e com o 1,8-cineol. Seus índices de retenção em coluna de fase estacionária não polar, variam no máximo de 5 unidades (*p*- cimeno IR 1026, limoneno IR 1031 e 1,8-cineol IR 1033 (Committee, 1993).

O cromatograma 21 (p.53) mostrar como os três monoterpenos eluíram, facilitando para o analista a visualização da existência de mais de um componente neste pico cromatográfico, que provavelmente passaria despercebido, pela busca automática da espectroteca e pelo analista.

A deconvolução de espectros mostrou neste tempo de retenção 8 máximos de pico, que variam entre 4,4% e 84% de pureza. Utilizando-se do recurso fornecido pelo programa de deconvolução podemos selecionar os íons característicos das substâncias, o que permitiu uma melhor visualização dos componentes sobrepostos (Cromatograma 21, p.53, 2ª Janela).



Cromatograma 20: CIT expandido (t_R 0,02 a 22,00 minutos) do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (obtido por coação). Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, FID 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100).

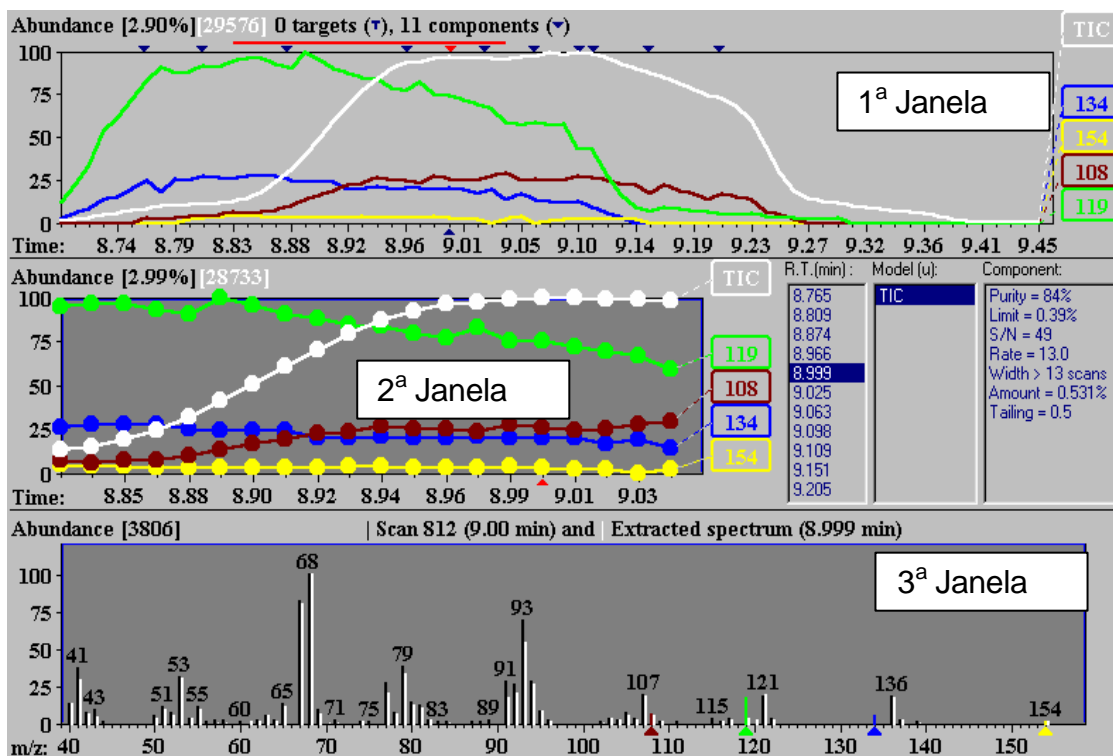


Espectro 8: E.M. do limoneno, obtido na espectroteca “NIST”

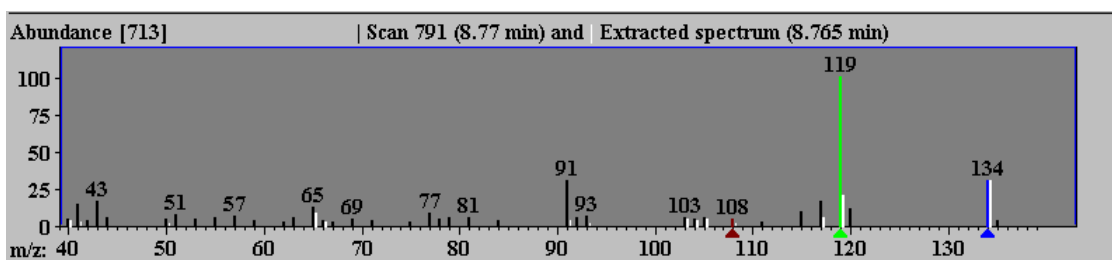
O processo de deconvolução de espectros realizado pelo método “AMDIS” do pico t_R 9,01 minutos (limoneno), mostrou que o pico não é de uma só substância. Seu espectro de massas, além dos íons característicos do limoneno apresenta íons $m/z = 119$ e $m/z = 134$ característicos do *p*-cimeno, e íons $m/z = 108$ e $m/z = 154$ característico do 1,8-cineol (Cromatograma-21,p.53).

Para melhor visualização selecionamos a cor verde (íon molecular $m/z = 119$) e a cor azul (íon molecular $m/z = 134$) indicando a presença do *p*-cimeno.

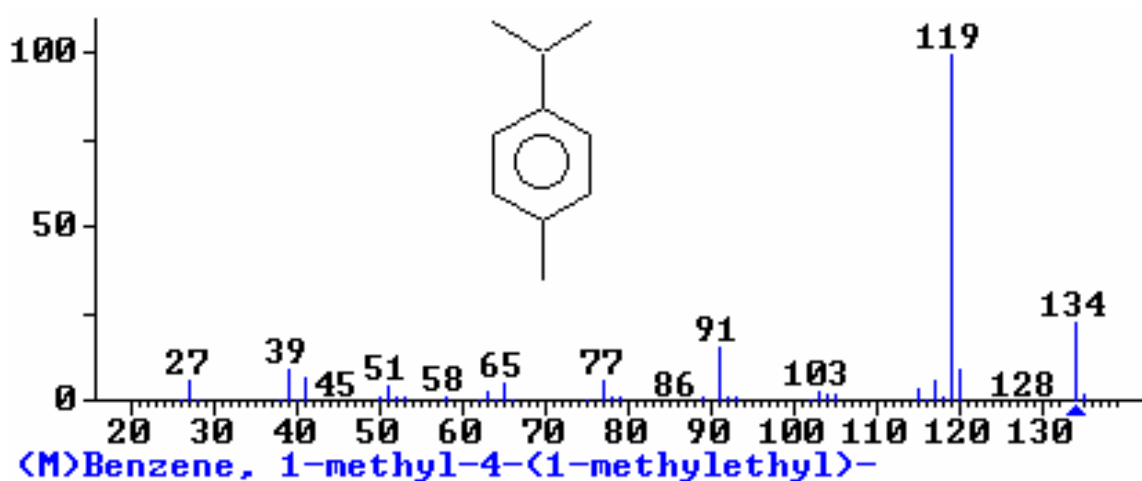
O espectro de massas do *p*-cimeno, obtido quando movemos o cursor para o t_r 8,765 (Espectro 9, p.54) que pode ser comparado com o espectro de massas do *p*-cimeno obtido da espectroteca “NIST” (Espectro 10, p. 54). Uma vez observado que o *p*-cimeno está no início do pico do limoneno (Cromatograma 21, p.53), pode-se comparar seu índice de retenção relativo com a literatura (Adams, 1995), e confirmar sua presença no óleo essencial de mirra, mesmo em baixíssima concentração.



Cromatograma 21: CIT expandido do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (1ª janela), (obtido por coabação). Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, FID 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100), Intensidade dos íons (2ª janela) e o espectro de massas deconvolvido do (t_r 9,01 min.) limoneno (3ª janela).



Espectro 9: E.M. deconvolvido do *p*-cimeno (t_R 8,765 min.), íons $m/z = 119$ e $m/z = 134$ constituinte do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. obtido após a deconvolução do pico do limoneno ($t_R = 9,01$ min.).



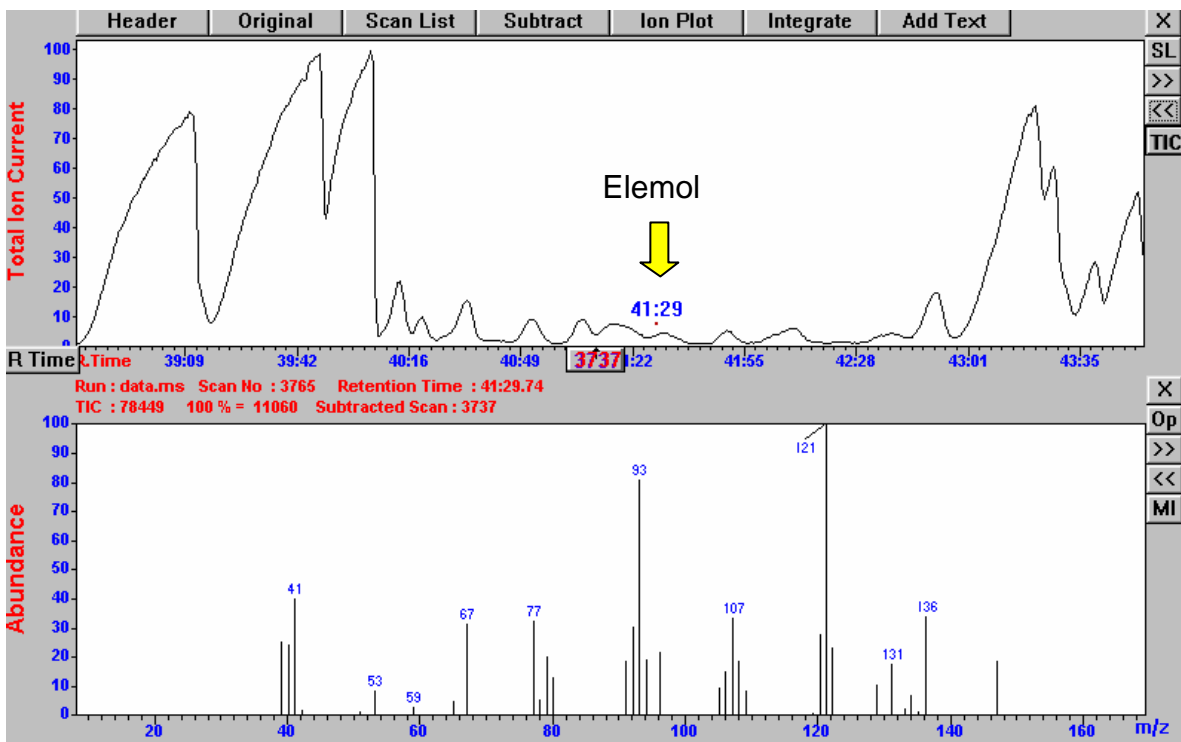
Espectro 10: E.M do *p*-cimeno, obtido na espectroteca “NIST”.

A presença do 1,8-cineol também pode ser vista no cromatograma 21 (p.53) com seus íons $m/z = 108$ (cor marron) e $m/z = 154$ (cor amarela). Neste caso observamos que o 1,8-cineol elui junto com o limoneno, dificultando a deconvolução de seu espectro para obtenção de um espectro puro. Assim sendo, verificou-se a eficiência do método “AMDIS”, que possibilitou o cálculo de seu índice de retenção (Tabela 7, p.71). A confirmação da identificação foi feita pela seqüência da ordem de eluição dos monoterpenos listada nas diversas literaturas.

A utilização da deconvolução de espectros confirmou a existência de *p*-cimeno e 1,8-cineol, como visto anteriormente na análise em coluna de fase estacionária polar (HP-FFAP).

Na análise do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. obtido por coação, em coluna não polar (HP-5), como já foi visto, não teríamos identificado o *p*-cimeno nem o 1,8-cineol pela busca automática da espectroteca “Wiley”. Por sua vez, o método “AMDIS” demonstrou sua capacidade de identificar substâncias com tempos de retenção muito próximos e substâncias coeluídas, através da deconvolução de espectros.

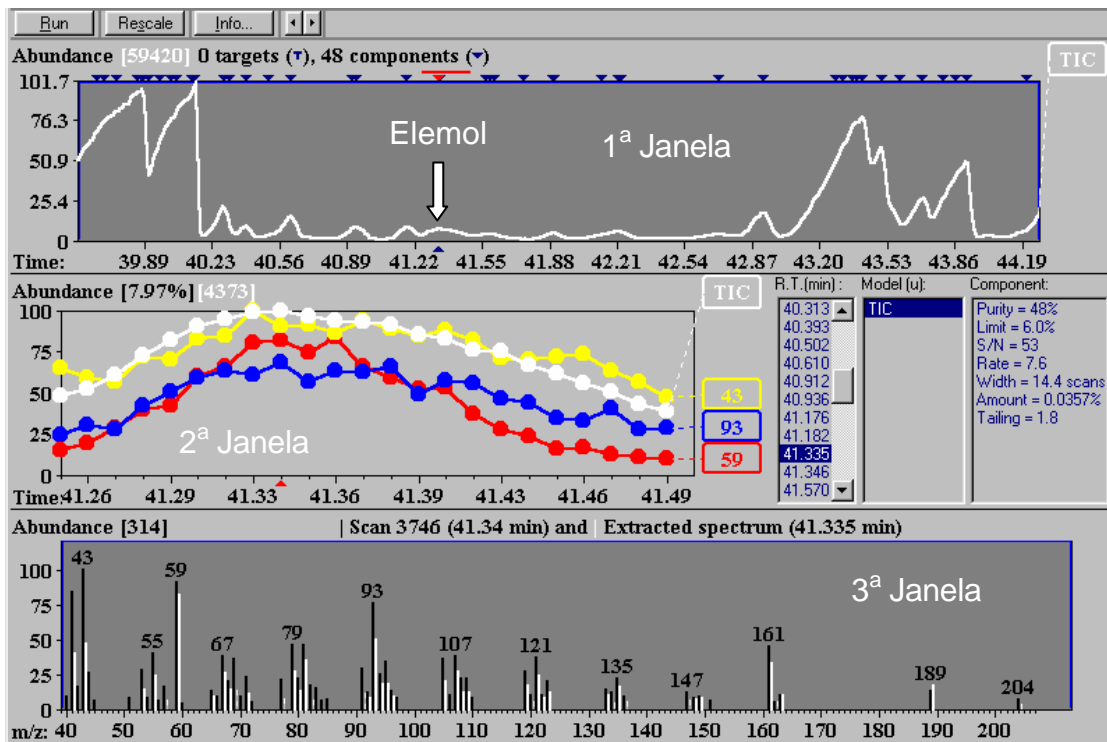
Outro exemplo no CIT (coobação e MEFS) que mostra a importância do “AMDIS” é no pico com o tempo de retenção de 41,29 min. Analisado no programa “Wsearch”, visualmente nesse tempo de retenção não aparece pico definido (simplesmente uma deformação na linha de base), e seu espectro de massas, mesmo após extração do fundo de ruído, apresenta-se, cheio de impurezas (Figura 7, p.58). Quando estes picos foram submetidos ao processo de busca automática “PBM” para sua provável identificação, obtivemos como resposta substâncias que não correspondiam ao esperado (substâncias características de óleos essenciais).



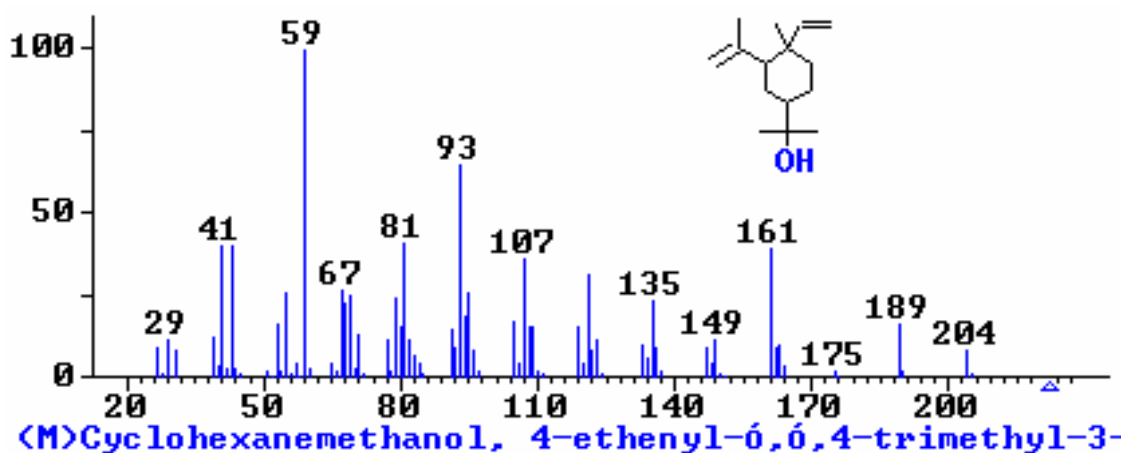
Cromatograma 22: CIT expandido do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (obtido por coação). Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, FID 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100) e o espectro de massas do tempo de retenção (t_R 41.29 min).

Ao realizarmos a deconvolução de espectros (programa “AMDIS”), no tempo de retenção 41,29 min (Cromatograma-22), obtivemos um espectro de massas deconvoluído (Cromatograma-23, p.57) que foi identificado após a busca automática com a espectroteca “NIST” (Espectro-11, p.57) como o sesquiterpeno oxigenado elemol.

No Cromatograma 23 abaixo, temos o espectro de massas obtido no tempo de retenção 41,335 minutos (íons na cor preta) e o espectro de massas deconvoluído (íons na cor branca), observamos que os íons moleculares $m/z = 41$, $m/z = 59$, $m/z = 93$, $m/z = 107$, $m/z = 121$, $m/z = 135$, $m/z = 161$ e $m/z = 189$ estão presentes no espectro que foi utilizado pela espectroteca “NIST” para busca automática (Espectro 11, p.57).



Cromatograma 23: CIT expandido do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (1ª Janela), (obtido por coobação). Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μm , 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, FID 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100), intensidade dos íons (2ª janela) e o espectro de massas deconvoluído do t_R 41,335 minutos (3ª janela).



Espectro 11: E.M. do elemol, obtido na espectroteca “NIST”

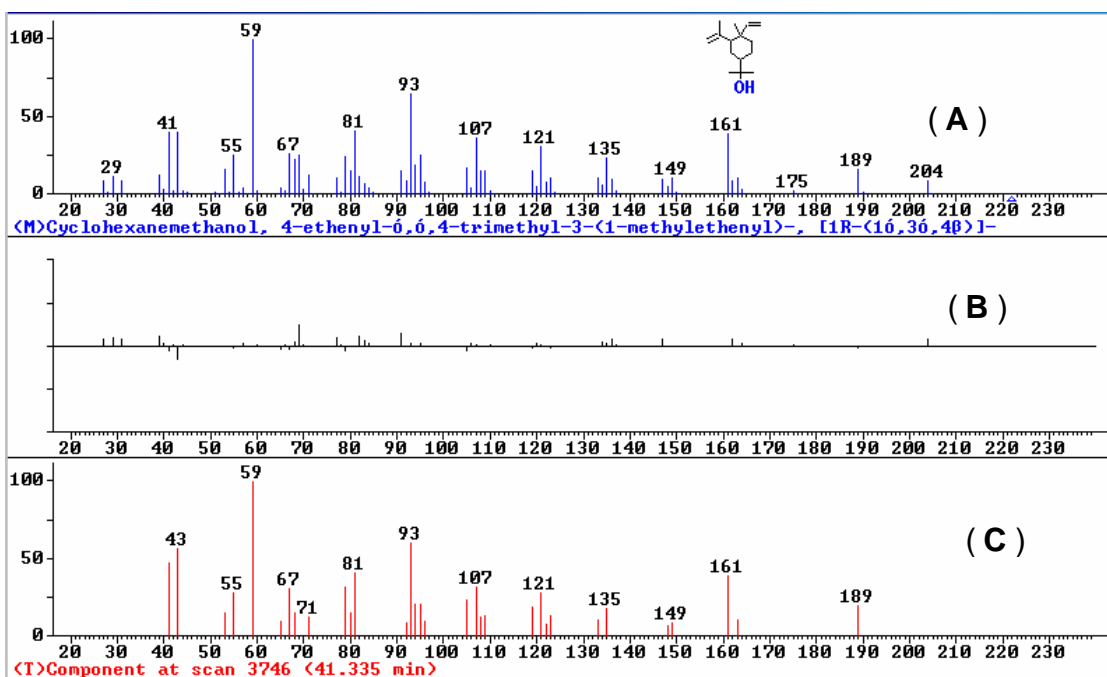


Figura 7: Resultado da comparação automática do elemol fornecida pela espectroteca “NIST”. (A) Espectro de massas do elemol da espectroteca “NIST”. (B) Demonstração da diferença entre os espectros. (C) Espectro de massas do tempo de retenção 41.335 minutos (elemol).

Uma comparação visual dos espectros da Figura 7 acima, demonstra semelhança entre os mesmos o que indica que podemos considerar a identificação como correta.

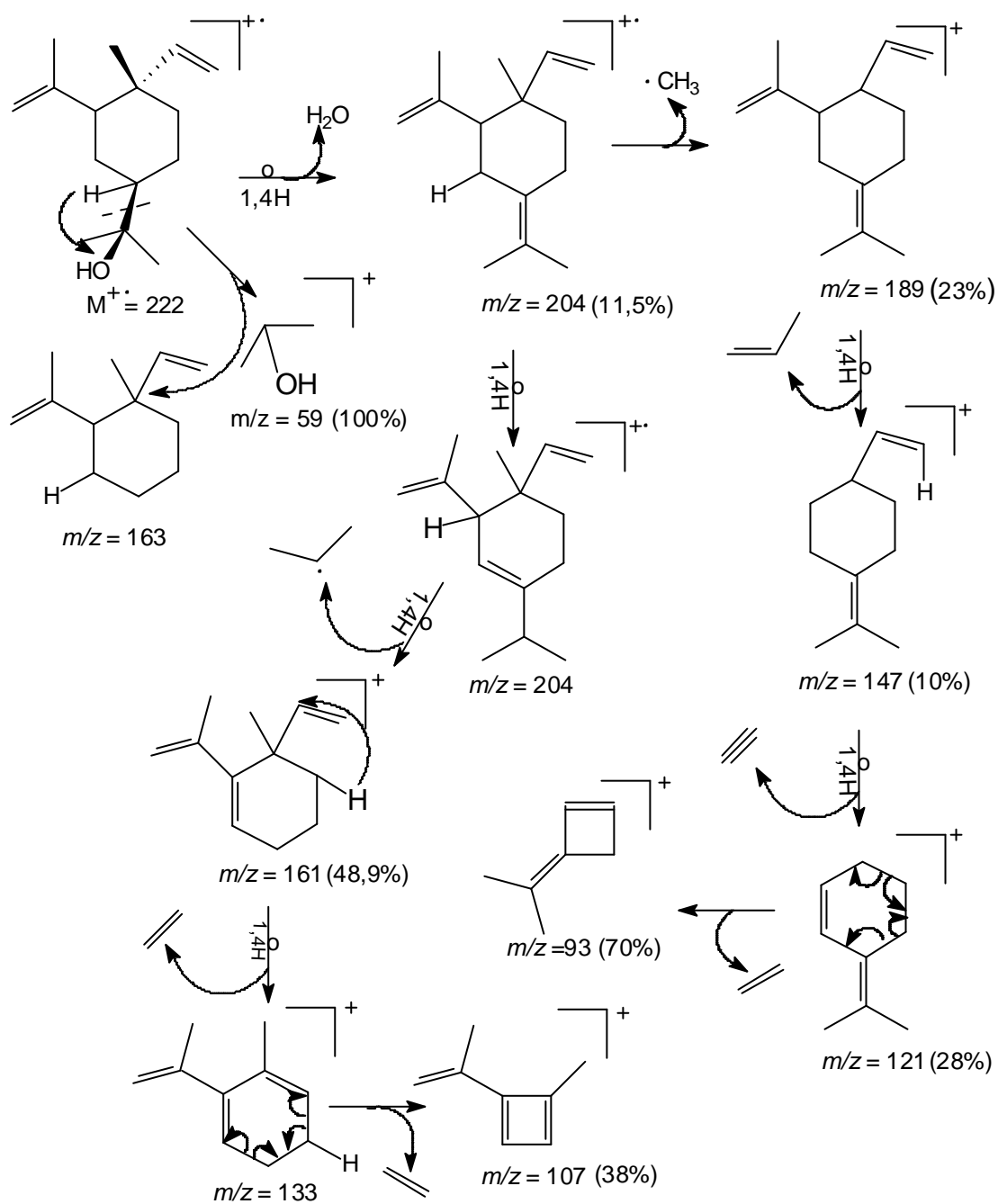
Neste exemplo mostramos como a deconvolução de espectros, realizada pelo programa “AMDIS”, é eficiente na remoção de interferentes.

Para uma melhor confirmação dos íons contidos no espectro de massas do elemol propusemos sua fragmentação (Quadro 2, p.59).

Na identificação do elemol os resultados obtidos demonstram que o “AMDIS” foi capaz de monitorar, através da deconvolução de espectros de massas, a presença de picos com baixíssimas concentrações que aparecem como uma pseudo deformação da linha de base.

Há uma pequena diferença nos tempos de retenção quando trabalhamos os picos no programa “Wsearch” e no “AMDIS”. Esta diferença ocorre devido a maximização, interpolação, centralização e eliminação de assimetria de picos feito pelo método “AMDIS” para detecção dos componentes (Figura 4, p.14).

Quadro-2: Proposta de fragmentação do elemol



Além do elemol podemos mostrar outros exemplos de identificação de substâncias em baixas concentrações e com resolução ruim.

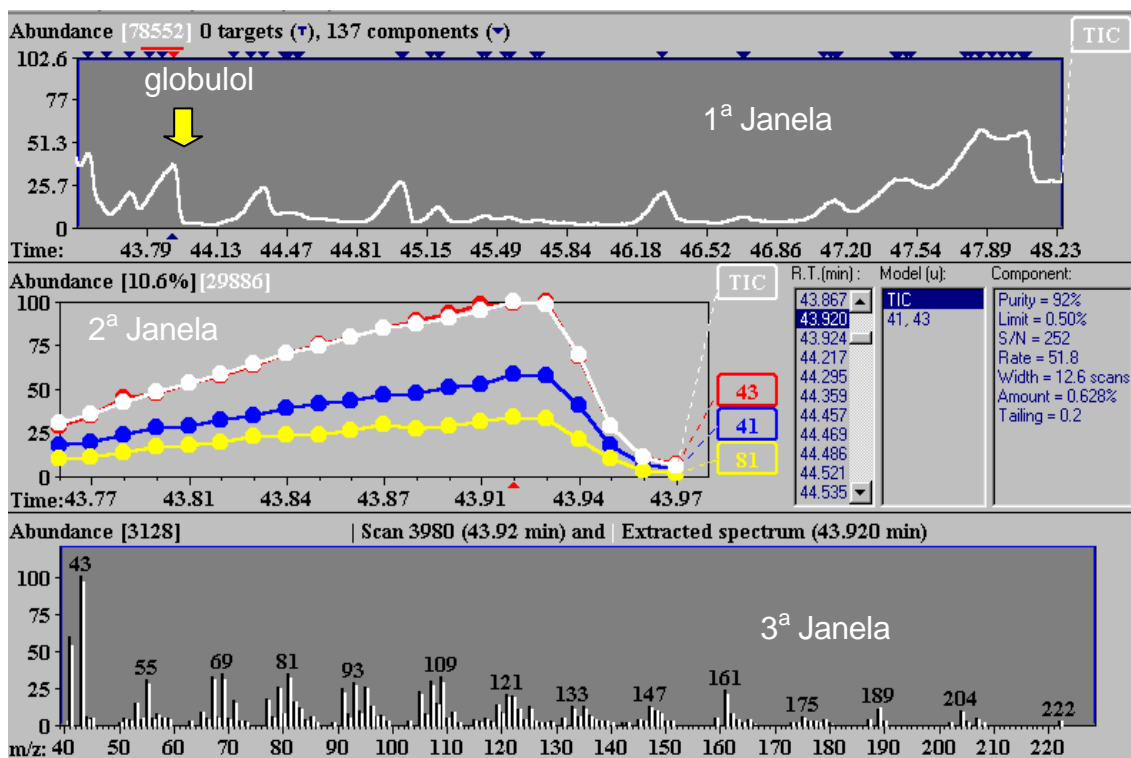
As análises foram realizadas pelos dois métodos: o tradicional de busca automática “PBM” utilizando a estação de dados da HP e a espectroteca “Wiley”, e pelo método “AMDIS” utilizando a espectroteca “NIST”, para que fosse avaliado o desempenho de cada um dos métodos na identificação dos constituintes voláteis do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd.

Os resultados obtidos foram de que os valores de “match” para o método “AMDIS” é maior para as substâncias que possuem picos contaminantes em seus espectros de massas, este fato demonstrou que a deconvolução de espectros de massas realizada pelo método “AMDIS”, foi eficiente na remoção de interferentes, proporcionando uma identificação automática dos espectros de massas de maneira mais eficiente do que pelo método “PBM”, com a tradicional busca reversa de espectros. Selecionamos algumas substâncias (Tabela 6) para demonstrar o resultado dos “Match” das identificações automáticas.

Tabela 6: Resultado da identificação automática de alguns constituintes do óleo essencial de mirra, obtidos por MEFS.

T_R (minutos)	Substância Identificada	“Match” “PBM”	“Match” “AMDIS”
41290	Elemol	45%	96%
43,506	Espatulenol	42%	88%
43,920	Globulol	66%	76%

A confirmação da presença do sesquiterpeno globulol (t_R 43,920 min.), no óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. só foi possível após a deconvolução de espectro (Cromatograma 24, p.61), que comparou automaticamente o espectro de massas obtido com o da espectroteca “NIST” (Figura 8, p.62). Como exemplo idêntico temos o espatulenol (Cromatograma 25, p.63) e todas as substâncias que estão listadas na Tabela-7, (p.71) e identificadas com a sigla (a ,d) e (b,d).



Cromatograma 24: CIT expandido do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (1^a janela), (obtido por cooção). Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, FID 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100), intensidade dos íons (2^a janela) e o espectro de massas deconvoluído do (t_R 43,920 min.) globulol 6 (3^a janela).

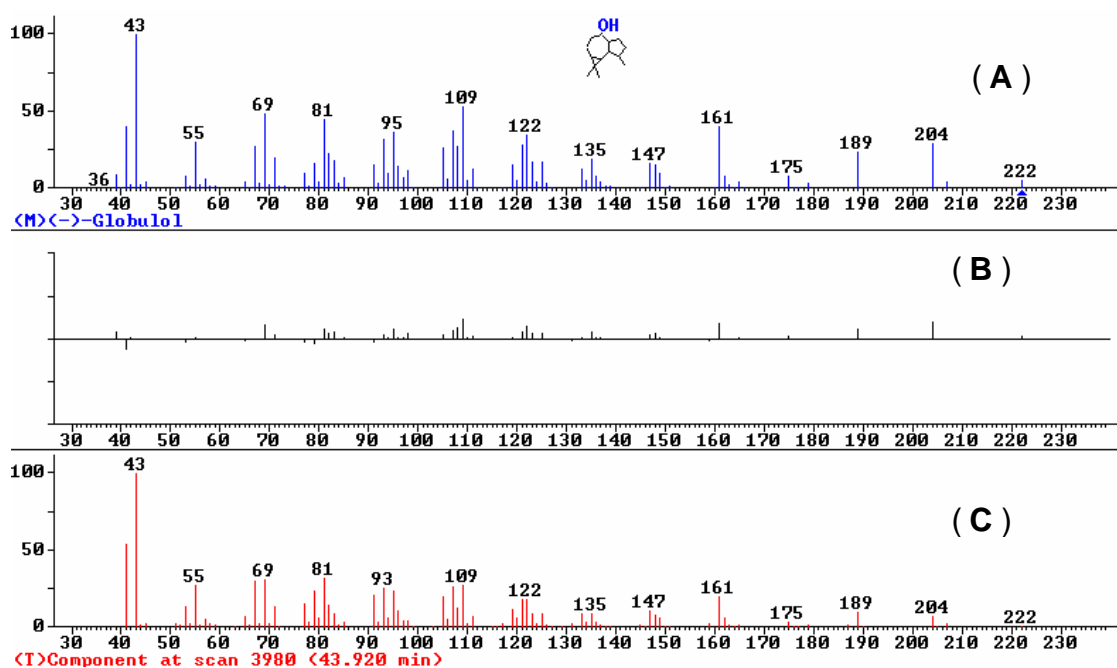
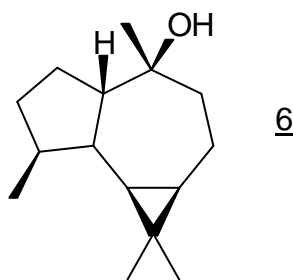
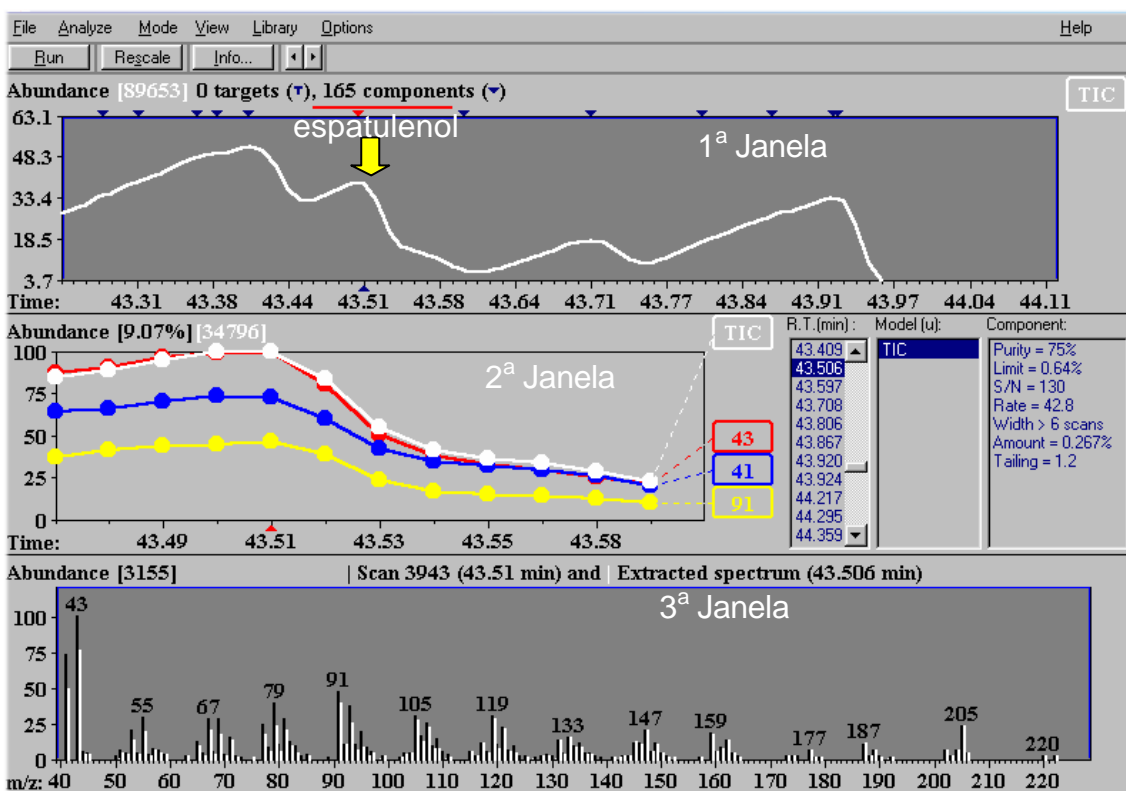


Figura 8: Resultado da comparação automática do espectro de massas deconvoluido do globulol (t_R 43,920 min.) com a espectroteca “NIST”. (A) Espectro de massas do elemol da espectroteca “NIST”, (B) demonstraçao da diferenca entre os espectros, (C) espectro de massas do tempo de retençao 43,920minutos (globulol 6).

Globulol





Cromatograma 25: CIT expandido do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (1ª Janela), (obtido por coação). Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, FID 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100), intensidade dos íons (2ª janela) e o espectro de massas deconvolvido do (t_R 43,506 min.) espatulenol (3ª janela).

A Figura 9 mostra a comparação automática do espectro de massas do espatulenol obtido no óleo essencial de mirra com o espectro de massas da espectroteca “NIST”.

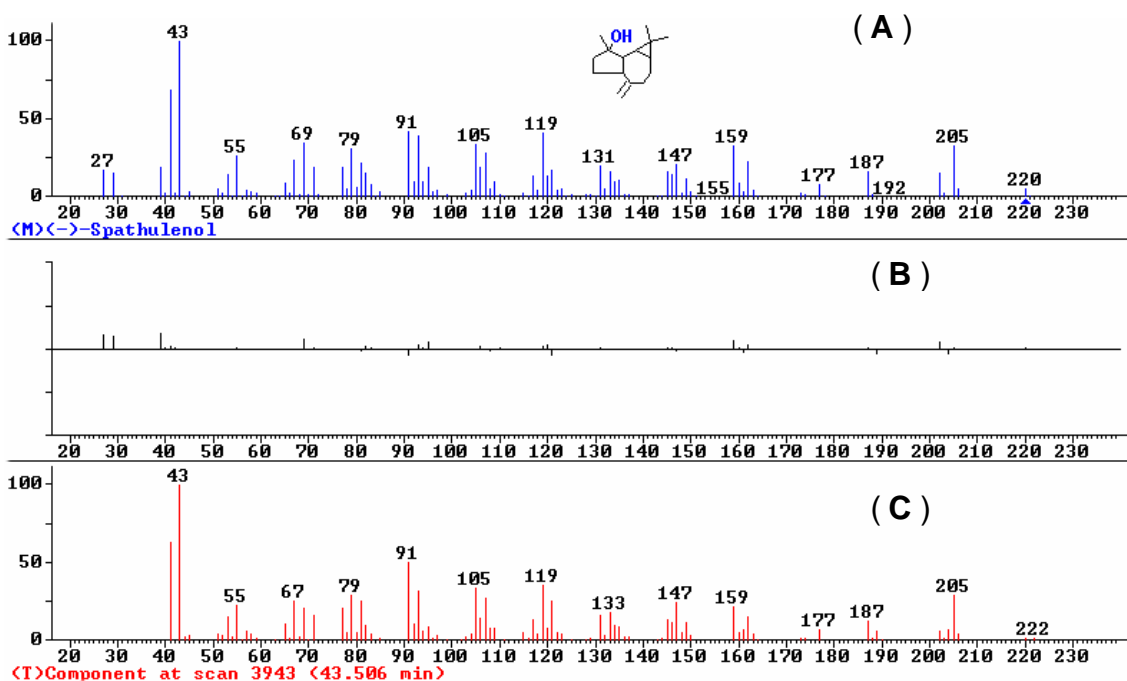
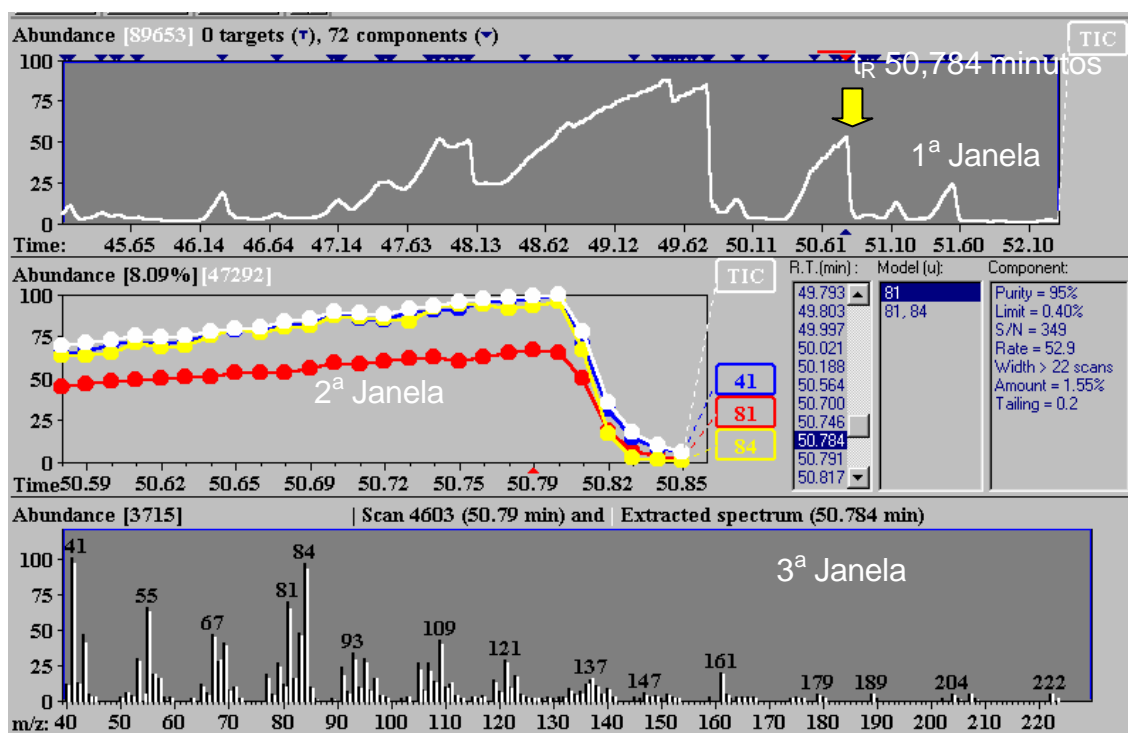


Figura 9: Resultado da comparação automática do espectro de massas deconvolvido do espatulenol fornecido pela espectroteca “NIST”. (A) Espectro de massas do espatulenol da espectroteca “NIST”, (B) Demonstração da diferença entre os espectros, (C) Espectro de massas do tempo de retenção 43,506 minutos (espatulenol).

A maior contribuição do método “AMDIS” foi o tratamento de análise do fator ruído, porém a maximização de picos como o único meio para identificar a presença de componentes pode causar problemas (Stein, 2000). Esse tipo de desvantagem deu-se com o sesquiterpeno shiobunol quando estudado pelo método de deconvolução de espectros no óleo essencial de mirra em coluna cromatografica não polar (HP-5).

No Cromatograma 26 (p.65), temos o pico de tempo de retenção 50,789 minutos, estudado pelo método “AMDIS”, onde observamos a desvantagem do método de deconvolução de espectros. Ocorreu que 3 componentes maximizaram juntos, logo, o método reportou um componente e extraiu um único espectro (3ª Janela). Na 2ª Janela, onde o método mostra o modelo de maximização utilizado par cada íon, observamos que os íons $m/z = 43$, $m/z = 81$ e $m/z = 84$ foram definidos como base da deconvolução do espectro. Desta forma não conseguimos identificar com segurança o pico em questão. A comparação automática com a espectroteca “NIST” (Figura-10, p.66), forneceu um “match” de 36% ocasionado muito provavelmente pelo íons de $m/z = 84$, que na nossa concepção é um íon interferente, dificultando assim a identificação deste constituinte.



Cromatograma 26: CIT expandido do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (1ª Janela), extraído por coação (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, FID 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100), intensidade dos íons (2ª janela) e o espectro de massas deconvoluído do t_R 50,784 min. (3ª janela).

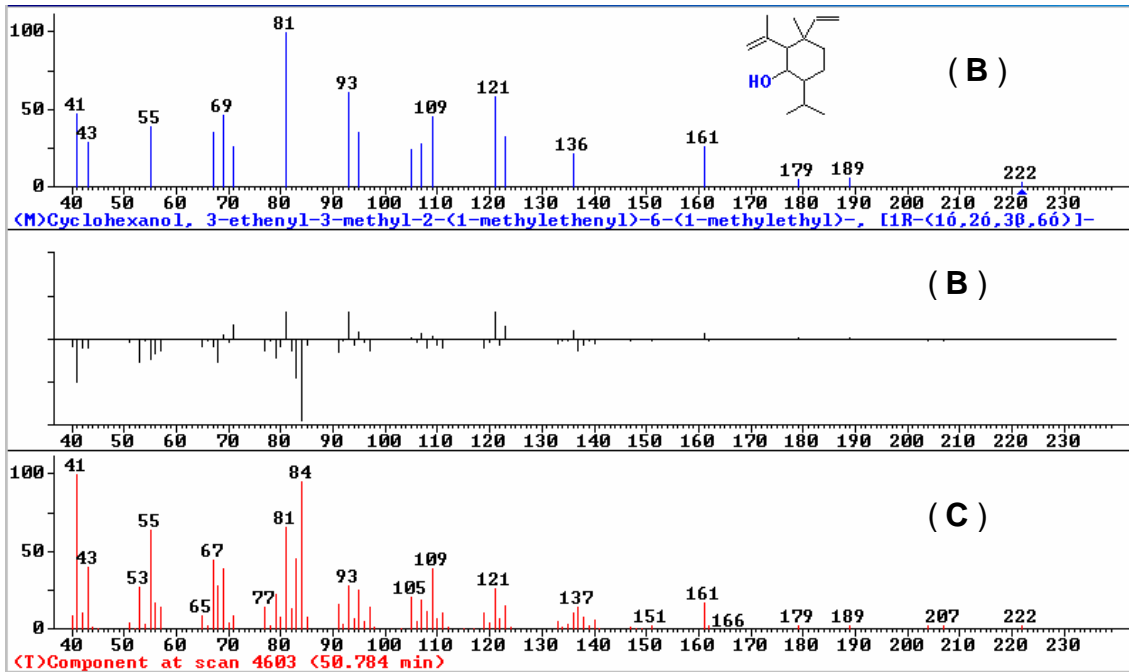


Figura 10: Resultado da comparação do espectro de massas deconvolvido do tempo de retenção 50,784 minutos com a espectroteca “NIST”. (A) Espectro de massas do shiobunol da espectroteca “NIST”, (B) Demonstração da diferença entre os espectros, (C) Espectro de massas do tempo de retenção 50,584 minutos.

Deconvolução dos diterpenos

Os diterpenos são substâncias pouco encontradas em óleos essenciais. Na literatura temos suas identificações através de um conjunto de técnicas, após árduas extrações, isolamentos e purificações com solventes. Muitos diterpenos são citados na literatura, sem seus espectros de massas, o que dificulta na identificação por CGAR-DSM ao trabalharmos essas substâncias encontradas em óleos essenciais.

Nesta parte do trabalho, além da deconvolução dos espectros, tivemos que utilizar alguns recursos do programa “AMDIS”. A janela de deconvolução usada até o momento que era de 8 varreduras passou para 12, aumentando a varredura em cima do pico selecionado. Assim encontramos melhores espectros deconvoluídos (mais limpos) tendo uma chance maior de acertos na busca automática com a espectroteca “NIST”.

Como exemplo temos o filocladeno. A diferença entre o espectro de massas encontrado na espectroteca “NIST”, e da substância de t_R 50,393 minutos é apenas na intensidade dos íons (Figura 11), que pode ser decorrente da quantidade deste constituinte contido no óleo essencial de mirra. O que só foi possível na técnica de MEFS.

Pela seqüência da ordem de eluição do índice de retenção (Adams, 1995) colocamos esse constituinte como uma substância com identificação provável, o mesmo ocorre com o *EPI*-laureno, laurenon-2-ona, *EPI* manool e o abietol citados na Tabela-7, (p.71) e destacados com símbolo #.

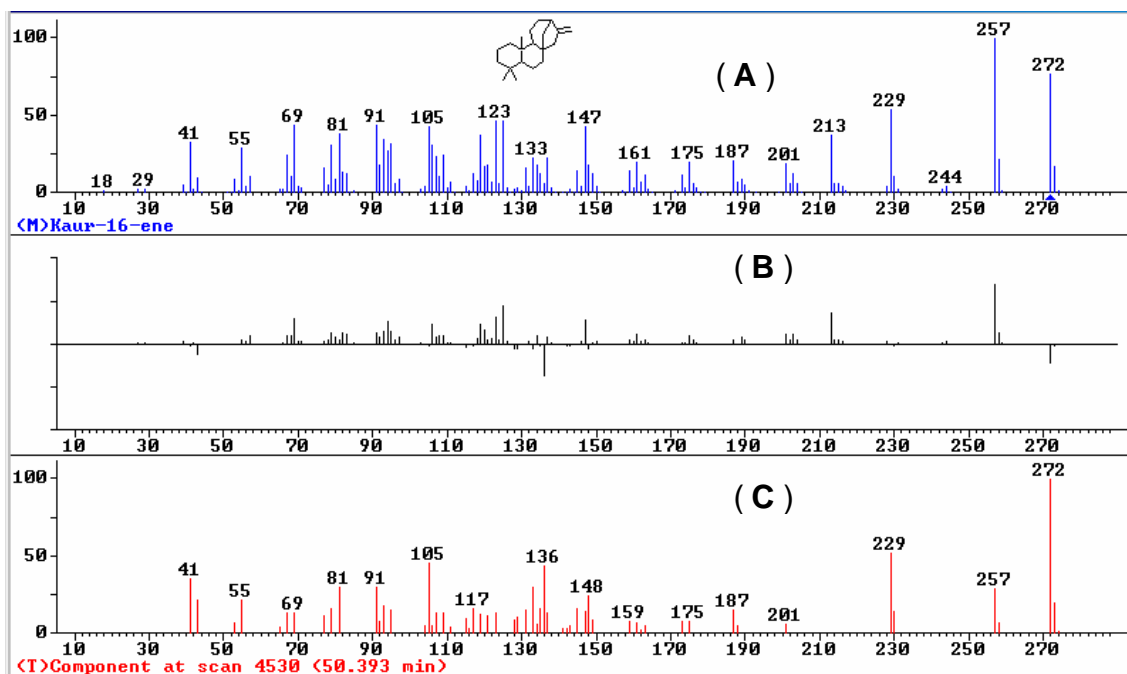


Figura 11: Resultado da comparação automática do espectro de massas deconvoluído do filocladeno com a espectroteca “NIST”. (A) Espectro de massas do filocladeno da espectroteca “NIST”, (B) Demonstração da diferença entre os espectros, (C) Espectro de massas do tempo de retenção 50.393 minutos (filocladeno 7).

Essa dificuldade descrita acima já não ocorreu com os diterpenos óxido de manoila (Figura 12, p.68) e o abietatrieno (Figura 13, p.69) suas diferenças de espectros de massas deconvoluídos não apresentam muita discrepância. Quando seus espectros de massas obtidos no óleo essencial de mirra, são comparados automaticamente com os contidos na espectroteca “NIST” fornecem um “match” acima de 80%. Seus picos no Cromatograma 27 (p.70), apresentam-se mais significativos (maior quantidade). Com esse resultado, os índices de retenção relativo de cada substância comparado com os da literatura (Adams, 1995), obtivemos suas identificações confirmadas, e mostramos a eficiência do método de identificação utilizado neste trabalho.

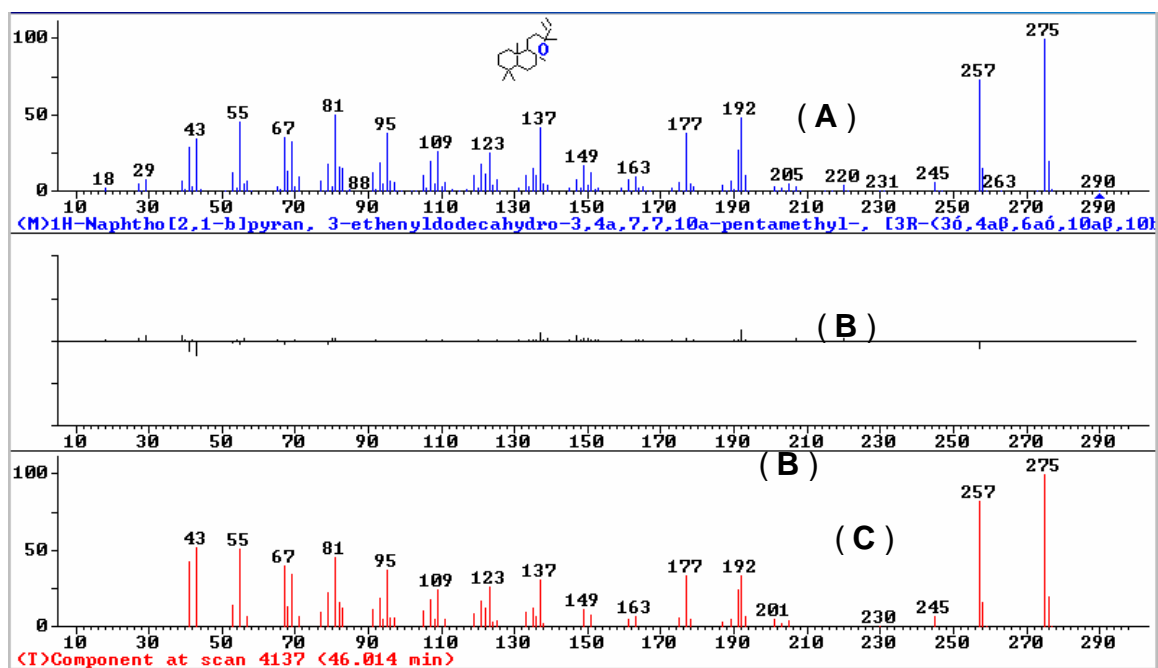
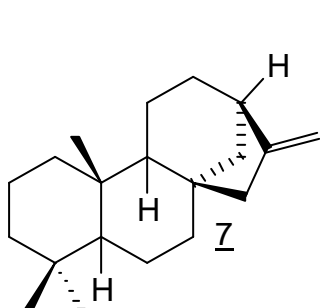
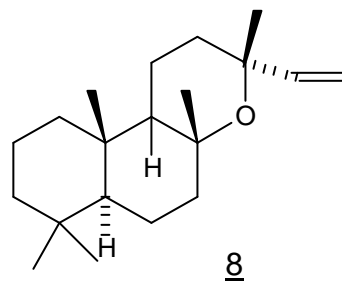


Figura 12: Resultado da comparação automática do espectro de massas deconvoluído do óxido de manoila com a espectroteca “NIST”. (A) Espectro de massas do óxido de manoila da espectroteca “NIST”, (B) Demonstração da diferença entre os espectros, (C) Espectro de massas do tempo de retenção 46.814 minutos



Filocladeno



Óxido de manoila

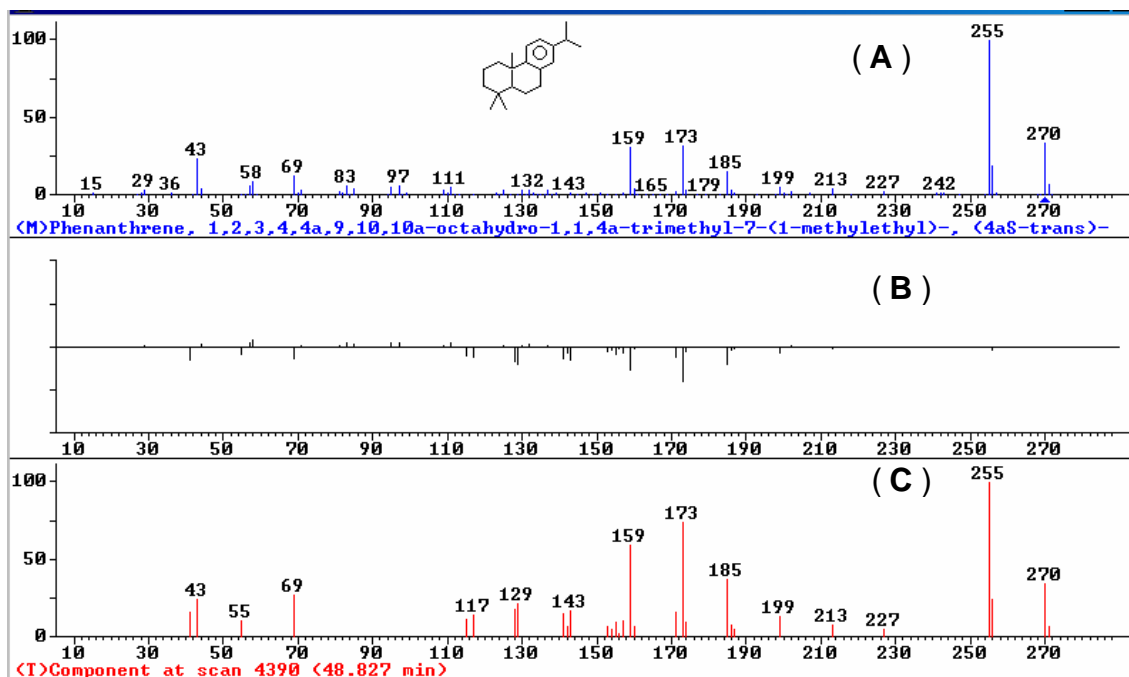
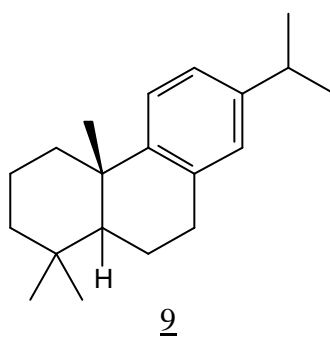
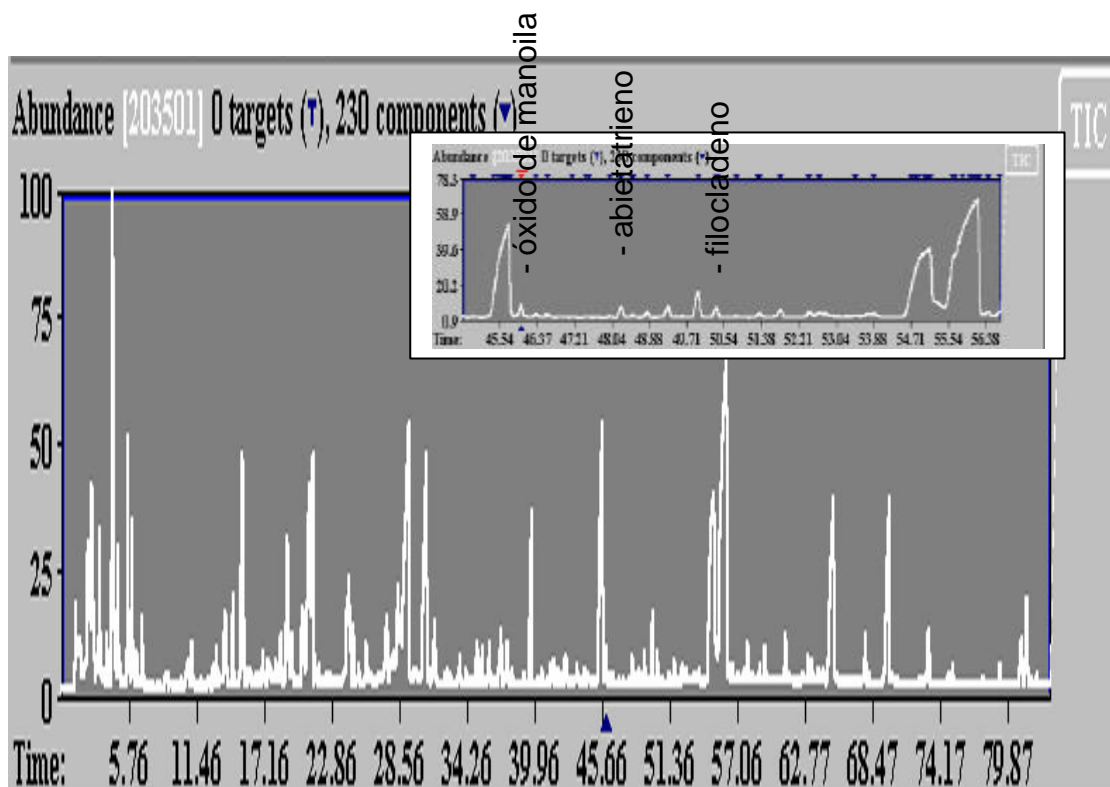


Figura 13: Resultado da comparação do espectro de massas deconvolvido do abietatrieno com a espectroteca “NIST”. (A) Espectro de massas do abietatrieno da espectroteca “NIST”, (B) Demonstração da diferença entre os espectros, (C) Espectro de massas do tempo de retenção 48.827 minutos (abietrieno 2).





Cromatograma 27: CIT do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. (obtido por MEFS com aquecimento). Condições de análise: coluna não polar (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, 60-300°C, tempo inicial de 1 min, 2°C/min, tempo final de 20 min, FID 300°C, gás de arraste hélio, fluxo da coluna 1mL / min, “split” de 1:100). Em destaque, expansão do CIT entre os t_R 45,54 e 56,38 minutos (óxido de manoilá, filocladeno e abietatrieno)

Em resumo, na corrida cromatográfica do óleo essencial de mirra, observou-se a presença de vários diterpenos. Apenas 8 estão listados na Tabela-7, (p.71), sendo que: 5 encontram-se como provável substância identificada, e os 4 restante tem sua identificação confirmada pelos seus espectros de massas e índices de retenção relativo comparado com a literatura (Adams, 1995).

Tabela 7: Identificação dos constituintes do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. em coluna de fase de baixa polaridade (5% difenil e 95% dimetil polisiloxano), (continua).

Componentes	IRR	% de Área	Peso molecular	Fórmula Molecular
(E)-2-hexanal ^(a)	854*	n. int	98	C ₆ H ₁₀ O
Triciclono ^{(a)(b)}	926*	n. int	136	C ₁₀ H ₁₆
α-tujeno ^{(a)(b)}	931*	n. int.	136	C ₁₀ H ₁₆
α-pineno ^{(a)(b)(c)}	938	2,18	136	C ₁₀ H ₁₆
α-fencheno ^{(b)(c)}	951*	n. int.	136	C ₁₀ H ₁₆
Canfeno ^{(a)(b)(c)}	952	1,62	136	C ₁₀ H ₁₆
Sabineno ^{(a)(b)(c)}	975	2,42	136	C ₁₀ H ₁₆
β-pineno ^{(a)(b)(c)}	980	1,29	136	C ₁₀ H ₁₆
Mirceno ^{(a)(c)}	992	0,29	136	C ₁₀ H ₁₆
α-felandreno ^{(a)(b)(c)}	1005	0,11	136	C ₁₀ H ₁₆
α-terpineno ^{(a)(b,d)(c)}	1018	0,25	136	C ₁₀ H ₁₆
p-cimeno ^{(a)(b,d)(c)}	1026	0,10	134	C ₁₀ H ₁₄
Limoneno ^{(a)(b)(c)}	1031	2,75	136	C ₁₀ H ₁₆
β-felandreno ^{(a,d)(b,d)(c)}	1031*	n. int.	136	C ₁₀ H ₁₆
1,8-cineol ^{(a,d)(b,d)(c)}	1033*	n. int.	154	C ₁₀ H ₁₈ O
(Z)-β-ocimeno ^{(a)(b)(c)}	1040	0,57	136	C ₁₀ H ₁₆
(E)-β-ocimeno ^{(a)(b)}	1050	0,06	136	C ₁₀ H ₁₆
γ-terpineno ^{(a)(b,d)(c)}	1062	0,49	136	C ₁₀ H ₁₆
(Z)-Sabineno hidratado ^{(a)(b)(c)}	1069	0,06	154	C ₁₀ H ₁₈ O
p-menta-2,4(8)-dieno ^{(b)(c)}	1086*	n. int.	136	C ₁₀ H ₁₆
Fenchona ^{(a)(b)(c)}	1087	19,91	154	C ₁₀ H ₁₆
(E)-Sabineno hidratado ^{(a)(b)(c)}	1097	0,40	154	C ₁₀ H ₁₈ O
Linalool ^{(a)(b)(c)}	1098	0,07	154	C ₁₀ H ₁₈ O
β-fenchol ^{(a)(b)(c)}	1116	1,84	154	C ₁₀ H ₁₆ O
Mircenol ^{(a,d)(b,d)(c,d)}	1118*	n. int.	154	C ₁₀ H ₁₈ O
(E)-pinanol-2 ^{(a)(b,d)(c,d)}	1119	0,10	154	C ₁₀ H ₁₈ O
(Z)-p-menta-2-en-1-ol ^{(a)(c,d)}	1121*	n. int	154	C ₁₀ H ₁₈ O
Pineno hidratado ^{(a,d)(b,d)}	1121*	n. int	154	C ₁₀ H ₁₈ O
Neo-allo-ocimeno ^{(a)(b)(c)}	1128	0,01	136	C ₁₀ H ₁₆
z-miroxido ^{(a,d)(b,d)(c,d)}	1133*	n. int	152	C ₁₀ H ₁₆ O
Cânfora ^{(a)(b)(c)}	1144	3,39	142	C ₁₀ H ₁₈ O
Borneol ^{(a)(b)(c)}	1166	1,24	154	C ₁₀ H ₁₈ O

‘Tabela 7 Continuação’: Identificação dos constituintes do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochestetter Codd. em coluna de fase de baixa polaridade (5% difenil e 95% dimetil polisiloxano). (continua).

Componentes	IRR	% de área	Peso molecular	Fórmula Molecular
<i>p</i> -menta-1,5-dienol-8 ^{(a,d)(b,d)(c,d)}	1167*	n. int.	152	C ₁₀ H ₁₆ O
Terpinol-4 ^{(a)(b)(c)}	1177	0,94	154	C ₁₀ H ₁₈ O
Isopinocanfeol ^{(a,d)(b,d)(c,d)}	1178*	n. int	154	C ₁₀ H ₁₈ O
<i>m</i> -cimen-8-ol ^{(a,d)(b,d)(c,d)}	1180*	n. int.	150	C ₁₀ H ₁₄ O
α-terpineol ^{(a)(b)(c)}	1189	0,68	154	C ₁₀ H ₁₈ O
(<i>Z</i>)-piperitol ^{(a,d)(b,d)(c,d)}	1194*	n. int	154	C ₁₀ H ₁₈ O
(<i>E</i>)-piperitol ^{(a,d)(b,d)(c,d)}	1206*	n. int.	154	C ₁₀ H ₁₈ O
Nerol ^{(a,d)(b,d)(c,d)}	1229*	n. int	154	C ₁₀ H ₁₈ O
(<i>E</i>) acetato crisantenila ^{(a,d)(b,d)(c,d)}	1236*	n. int	194	C ₁₂ H ₁₈ O ₂
Acetato de bornila ^{(a,d)(b,d)(c,d)}	1286*	n. int	196	C ₁₂ H ₂₀ O ₂
δ-elemeno ^{(a)(b)(c)}	1339	0,18	204	C ₁₅ H ₂₄
α-cubebeno ^{(a)(b)(c)}	1351	0,06	204	C ₁₅ H ₂₄
Eugenol ^{(a)(b)(c)}	1356	0,04	164	C ₁₀ H ₁₂ O ₂
Ciclosativeno ^{(a)(c)}	1368	0,19	204	C ₁₅ H ₂₄
α-copaeno ^{(b)(c)}	1376*	n. int	204	C ₁₅ H ₂₄
β-cubebeno ^{(a,d)(b,d)(c)}	1390*	n. int	204	C ₁₅ H ₂₄
β-elemeno ^{(a)(c)}	1391	0,29	204	C ₁₅ H ₂₄
Cipereno ^{(a)(b)(c)}	1398	0,64	204	C ₁₅ H ₂₄
<i>cis</i> -cariofileno ^{(a)(b)(c)}	1404	3,87	204	C ₁₅ H ₂₄
α-(<i>E</i>)-bergamoteno ^{(a)(b)(c)}	1436	0,41	204	C ₁₅ H ₂₄
α-guaieno ^{(a)(b)(c)}	1439	0,05	204	C ₁₅ H ₂₄
β-(<i>Z</i>)-farneseno ^{(a)(b)(c)}	1444	0,08	204	C ₁₅ H ₂₄
α-humuleno ^{(a)(b)(c)}	1454	0,23	204	C ₁₅ H ₂₄
β-(<i>E</i>)-farneseno ^{(b)(c)}	1458*	n. int	204	C ₁₅ H ₂₄
Diidroaromadendreno ^{(a)(b)(c)}	1459	0,13	204	C ₁₅ H ₂₄
(<i>Z</i>)-muurola-4(14),5-dieno ^{(a)(b)(c)}	1460	0,10	204	C ₁₅ H ₂₄
Alloaromadendreno ^{(b,d)(c)}	1462	n. int	204	C ₁₅ H ₂₄
γ-muuroloeno ^{(a)(b)(c)}	1477	0,08	204	C ₁₅ H ₂₄
Germacreno D ^{(a)(b,d)(c)}	1481	0,14	204	C ₁₅ H ₂₄
β-(<i>Z</i>)-guaieno ^{(a,d)(c)}	1490	n. int	204	C ₁₅ H ₂₄
Valenceno ^{(a)(c)}	1491	0,13	204	C ₁₅ H ₂₄
Viridifloreno ^{(a)(c)}	1493	0,29	204	C ₁₅ H ₂₄
Biciclogermacreno ^{(a)(b,d)(c)}	1494	2,23	204	C ₁₅ H ₂₄
α - muuroloeno ^{(a)(b)(c)}	1499	1,25	204	C ₁₅ H ₂₄

'Tabela 7 Continuação'. Identificação dos constituintes do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. em coluna de fase de baixa polaridade (5% difenil e 95% dimetil polisiloxano), (continua).

Componentes	IRR	% de área	Peso molecular	Fórmula Molecular
α -bulneseno ^{(b,d)(c)}	1506*	n. int	204	C ₁₅ H ₂₄
(E,E)- α -farneseno ^(a)	1508	n. int	204	C ₁₅ H ₂₄
γ -cadineno ^{(a)(b)(c)}	1514	0,49	204	C ₁₅ H ₂₄
(z)- γ -bisaboleno ^(a)	1515	0,45	204	C ₁₅ H ₂₄
Endo-1-bourbonol ^(a)	1515	0,20	222	C ₁₅ H ₂₆ O
Cubebol ^{(a,d)(c)}	1515*	n. int	222	C ₁₅ H ₂₆ O
(z)-calameneno ^(c)	1524	0,17	202	C ₁₅ H ₂₂
δ -cadineno ^(c)	1524	3,13	204	C ₁₅ H ₂₄
Cadina-1,4-dieno ^{(a)(b)(c)}	1532	0,07	204	C ₁₅ H ₂₄
α -cadineno ^{(a)(b)(c)}	1539	0,18	204	C ₁₅ H ₂₄
α -calacoreno ^{(a,d)(b,d)(c)}	1542*	n. int	200	C ₁₅ H ₂₀
Elemol ^{(a,d)(b,d)(c)}	1549*	n. int	222	C ₁₅ H ₂₆ O
Germareno B ^{(a,d)(b,d)(c)}	1557*	n. int	204	C ₁₅ H ₂₄
β -calacoreno ^{(a,d)(b,d)(c)}	1563*	n. int	200	C ₁₅ H ₂₀
Nerolidol ^{(a,d)(b,d)(c)}	1564*	n. int	222	C ₁₅ H ₂₆ O
Ledol ^{(a)(c)}	1566*	0,11	222	C ₁₅ H ₂₆ O
Cariofilenol ^(b,d)	1568*	n. inrt	222	C ₁₅ H ₂₆ O
Germacreno D-4-ol ^{(a)(b)(c)}	1575	0,99	222	C ₁₅ H ₂₆ O
Espatulenol ^{(a,d)(b,d)(c)}	1576*	n. int	220	C ₁₅ H ₂₄ O
Óxido de cariofileno ^{(b,d)(c)}	1581	0,23	220	C ₁₅ H ₂₄ O
Globulol ^{(a)(b,d)(c)}	1584	0,52	220	C ₁₅ H ₂₆ O
β -copaen-4 α -ol ^(a)	1584	0,09	220	C ₁₅ H ₂₄ O
Trans- β -elemenone ^(a)	1600	0,06	218	C ₁₅ H ₂₂ O
β -oploperone ^{(a)(b,d)(c)}	1606	0,19	220	C ₁₅ H ₂₄ O
<i>EPI</i> -cubenol 1,10 ^{(a)(c)}	1615	0,09	222	C ₁₅ H ₂₆ O
<i>EPI</i> -cubenol 1 ^{(a)(c)}	1628	0,09	222	C ₁₅ H ₂₆ O
<i>EPI</i> - α -cadinol ^{(a,d)(b,d)(c)}	1641	0,09	222	C ₁₅ H ₂₆ O
<i>EPI</i> - α -muurolol ^{(a)(b,d)(c)}	1642	2,59	222	C ₁₅ H ₂₆ O
Cubenol ^{(b)(c)}	1643	1,38	222	C ₁₅ H ₂₆ O
α -cadinol ^{(a)(b)(c)}	1652	5,15	222	C ₁₅ H ₂₆ O
<i>EPI</i> -(E)-cariofileno 14 hidroxil ^{(a)(b)(c)}	1665	12,30	220	C ₁₅ H ₂₄ O
α -bisabolol ^(a)	1682	0,18	222	C ₁₅ H ₂₆ O
α -muuroleno 14 hidroxil ^{(b,d)©}	1775*	n. int	220	C ₁₅ H ₂₄ O
(Z)- α -acetato de santalol ^{(b,d)(c,d)}	1783*	n.int	262	C ₁₇ H ₂₆ O ₂

‘Tabela 7 Continuação’. Identificação dos constituintes do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. em coluna de fase de baixa polaridade (5% difenil e 95% dimetil polisiloxano).

Componentes	IRR	% de área	Peso molecular	Fórmula Molecular
acetato de bisaboleno ^{(a,d) (b,d) (c,d)}	1786*	n.int	264	C ₁₇ H ₂₈ O ₂
Cedren-13-ol-acetato <8> ^{(a,d) (b,d) (c)}	1795*	n.int	262	C ₁₇ H ₂₆ O ₂
Nootkatone ^{(b,d) (c,d)}	1800*	n.int	218	C ₁₅ H ₂₂ O
EPI-(Z)- acetato de santalol ^{(b,d) (c,d)}	1809*	n.int	262	C ₁₇ H ₂₆ O ₂
β-vitivone ^{(a,d) (b,d) (c)}	1809*	n.int	218	C ₁₅ H ₂₂ O
acetato de oplopanonila ^{(a,d) (b,d) (c)}	1881*	n.int	280	C ₁₇ H ₂₈ O ₃
Isobornil isobutirato isobutiriloxi ^{(a,d)(b,d)(c,d)}	1887*	n.int	310	C ₁₈ H ₃₀ O ₄
EPI-laurene ^{(b,d) (c,d)} # IR 1891	*	n.int	272	C ₂₀ H ₃₂
Filocladeno ^{(a,d) (b,d) (c,d)} # IR 2011	*	n.int	272	C ₂₀ H ₃₂
Abietatrieno ^{(a) (b) (c)}	2053	0,04	270	C ₂₀ H ₃₀
Abietadieno ^{(a) (b) (c)}	2079	0,11	272	C ₂₀ H ₃₂
Laurenon-2-one ^{(b,d) (c,d)} # IR 2107	*	n. int.	288	C ₂₀ H ₃₂ O
Abietol ^{(b,d) (c,d)} # IR 2391	*	n. int.	288	C ₂₀ H ₃₂ O

(a) = Composto identificado pela busca automática das espectrotecas “Wiley”, “NIST”, e a literatura (Adams, 1995).

(b) = Microextração em fase sólida com aquecimento

(c) = Microextração em fase sólida sem aquecimento

(d) = “AMDIS”

n. int. = Pico não integrado

* = Índice de retenção relativo obtido pela regra de três, velocidade do papel = cm/min, e a medida da distância percorrida em centímetros.

= Substâncias com identificações prováveis.

(a,d) , (b,d) e (c,d) = São compostos analisadas com o método de deconvolução de espectros

IRR = Índice de retenção relativo

EXPERIMENTAL

Coleta e classificação botânica da espécie *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd.

A espécie em estudo foi cultivada na EMBRAPA Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Ocidental de Manaus, em solo Latossolo amarelo, textura muito argiloso e de baixa fertilidade, pelo pesquisador Antônio Franco Sá Sobrinho. É conhecida popularmente como “mirra”.

Classificada primeiramente pela Dr^a Elsie Franklin Guimarães, Botânica especialista em Piperaceae do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, como *Moschosma riparium* Hochst. (Lamiaceae). Sua exsicata foi enviada ao especialista em Lamiaceae Dr. Harold Harvest em Londres para uma correta identificação.

Obtenção do óleo essencial

Após a coleta, as folhas frescas (1243,5g) foram devidamente limpas (sem areia), picadas, pesadas e colocadas em um balão de 12 litros, emergidas em água para a extração do óleo essencial por coação, com rendimento de 0,39% de óleo essencial.

Obtenção dos índices físico-químicos

A densidade relativa do óleo essencial foi determinada a 20°C em um densímetro digital AP PAAR DMA-46 seguindo norma da “American Society for Test Materials” (ASTM 4052-91).

O índice de refração do óleo essencial foi obtido em refratômetro do tipo “Abbe” da “Bausch” e “Lomb”, segundo a norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR 5785-85).

Rotação óptica específica do óleo essencial foi determinada em polarímetro digital, modelo 341-Perkin Elmer, segundo a norma da ABNT, referente ao método de ensaio de determinação de rotação óptica e rotação óptica específica em óleos essenciais. (NBR 5783-87).

Instrumentação

A análise por cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) do óleo essencial obtido da espécie estudada, foi feita em cromatógrafo gasoso “Hewlett Packard” 5890, séries II integrador 3396 A, em duas colunas de polaridades diferentes, nas seguintes condições:

Coluna polar polietileno glicol (HP-FFAP) 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, temperatura inicial de 60°C, tempo inicial de 1 min, velocidade de aquecimento de 2°C/min, temperatura final de 220°C, tempo final de 40 min, temperatura do injetor de

250°C, temperatura do detetor de 280°C, detetor de ionização de chama, gás de arraste hidrogênio, fluxo da coluna de 1mL / min e razão “split” de 1:100.

Coluna não polar 5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano (HP-5), 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, temperatura inicial de 60°C, tempo inicial de 1 min, velocidade de aquecimento 2°C/min, temperatura final 300°C, tempo final de 20 min, temperatura do injetor 280°C, temperatura do detetor 300°C, detetor de ionização de chama, gás de arraste hidrogênio e fluxo da coluna de 1mL / min e razão “split” de 1:100.

Para análise de CGAR-DSM dos componentes dos óleos essenciais, utilizamos um cromatógrafo gasoso (HP-5890 séries II) com detetor seletivo de massas (MSD-5970) computadorizado (HP-7958 B) com analisador de massas quadrupolar e ionização por impacto de elétrons a 70 eV.

As condições de análise para cromatografia gasosa de alta resolução com detetor seletivo de massas (CGAR-DSM), foi idêntica à utilizada na CGAR em coluna não polar (HP-5) com exceção do gás de arraste, que foi hélio.

Para análise de Micro-extração em fase sólida (MEFS) sem aquecimento, utilizou-se um cromatógrafo gasoso Varian Saturn 2000 com analisador “Ion Trap” e injetor automático CX 8200 modo MEFS, com fibra de fase estacionária polidimetilsiloxano (100 µm, Supelco). Coluna de fase estacionária não polar 5% difenil 95% dimetilpolisiloxano (HP-5), 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, as condições de análise para cromatografia gasosa de alta resolução com analisador “ion Trap”, foram idênticas às utilizadas na CGAR, com exceção do gás de arraste, que foi hélio.

Índice de retenção

Os padrões de hidrocarbonetos lineares C₇ a C₂₇, utilizados para determinação do índice de retenção, são da marca “Aldrich”. As condições de análise para as duas colunas de fases estacionárias diferentes encontram-se no item (instrumentação).

Micro-extração em fase sólida

Na análise da composição química do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. extraído por microextração em fase sólida (MEFS), utilizamos uma folha seca da planta, trituradas manualmente para um frasco de 20 ml devidamente fechado com septo e selador de alumínio. A micro-extração em fase sólida a quente, foi efetuada com seringa manual e fibra com fase estacionária de polidimetilsiloxano {100mm de espessura (Supelco) e banho maria, por 3 min. 5 min. e 10 min.

A dessorção térmica do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd extraído por MEFS com adsorção a quente foi feita dentro do injetor do cromatógrafo gasoso HP 5890 Séries II a 250°C, com detetor seletivo de massas (MSD-5970) computadorizado (HP-7958 B), com analisador de massas quadrupolar e ionização por impacto de elétrons a 70 eV. A coluna capilar utilizada foi com fase de 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano (HP-5) nas mesmas condições da análise por CG-DSM.

Outro experimento a MEFS sem aquecimento, foi efetuado em aparelho CGAR-DSM com injetor automático, sendo a micro-extração feita com 60 minutos de extração sem aquecimento e 30 minutos de dessorção a 280°C no injetor do cromatógrafo gasoso, o restante das condições de análise são idênticas as citadas para CGAR-DSM.

Programas utilizados neste trabalho:

Saturno 2000 com espectroteca NIST 98

“Chemstation” HP com espectroteca de massas Willey

“Wsearch Mass Spectral Search Program” com espectroteca NIST 95 (50.000)

“Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System” (AMDIS)

O programa “AMDIS”- “Automated Mass Deconvolution and Identifications System” versão 1.0 , foi utilizado no auxílio da identificação dos espectros.

O controle de aquisição de dados foi feito através do sistema “chemwindow”, instalado em um microcomputador HP 9000. Uma vez que o equipamento é antigo e utiliza sistema operacional HO-UX, incompatível com os programas de identificação mais recentes, e que possui mídias de armazenamento de dados (disquete, fitas DAT) não intercambiáveis, foi necessária a utilização de uma conexão em rede para transferir os dados para um outro microcomputador, onde foi feita toda a parte de interpretação dos dados.

Os programas citados acima foram instalados em um microcomputador “pentium” III 550 MHz, com memória “RAM” de 64 MB.

CAPÍTULO II

**Atividade Antiinflamatória, Tripanomicida e
Antineoplásica do Óleo Essencial de
Tetradenia riparia Hochstetter Codd.**

INTRODUÇÃO DO CAPÍTULO II

Inflamação

Quando um tecido vascularizado entra em contato com um agente irritante, de origem química, física ou biológica a resposta do organismo será uma série de eventos vasculares e celulares que resultarão nos seguintes estímulos inflamatórios: rubor, calor, dor, tumor, podendo levar a perda de função do tecido. A esta resposta damos o nome de reação inflamatória (Rocha e Silva, 1978).

Estes estímulos inflamatórios levam a liberação ou síntese de mediadores químicos, que tem como objetivo resolver as injúrias causadas pelos estímulos inflamatórios.

A resposta inflamatória não é desenvolvida para injuriar o organismo, mas sim, para permitir que o tecido afetado retorne ao estado saudável.

As alterações vasculares iniciam-se imediatamente e desenvolvem-se durante as primeiras horas após o estímulo inflamatório, e consistem em: vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo seguido por êxtase, aumento de permeabilidade vascular e exsudação de plasma. Estes eventos têm como principal função facilitar o acesso ao sítio inflamatório pelos mediadores plasmáticos e células sanguíneas (Figura 14, p.79).

A mobilização adequada dos leucócitos circulantes para o local da injúria é fundamental para a defesa do organismo. No entanto, nos casos em que o processo inflamatório é persistente, o acúmulo de células pode ser lesivo ao tecido.

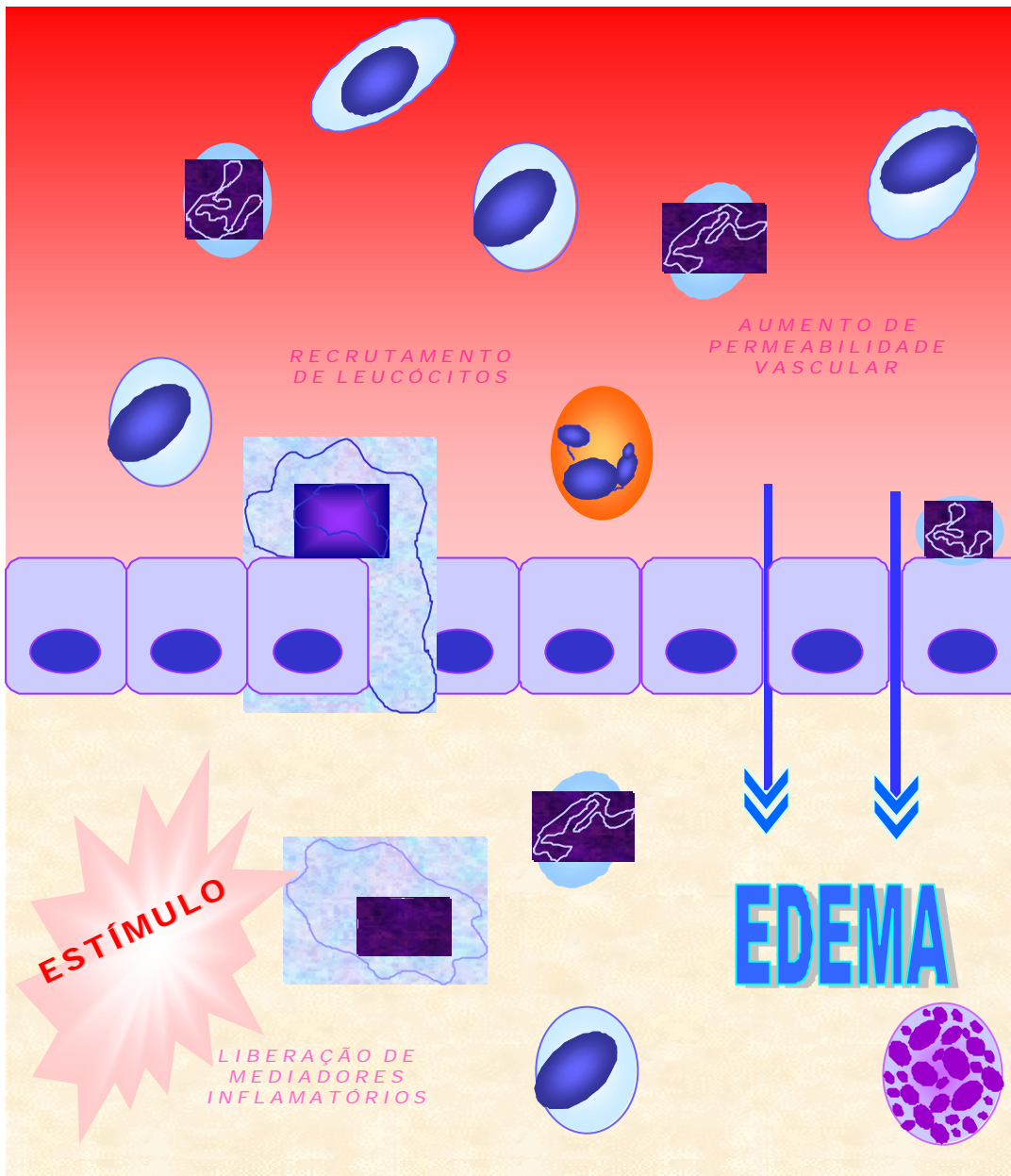


Figura 14: Reação inflamatória, fenômeno estereotipado cujos sinais são rubor, tumor, calor e dor. As alterações vasculares (vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo seguido por estase, aumento de permeabilidade vascular) iniciam-se imediatamente e desenvolvem-se durante as primeiras horas após o estímulo inflamatório.

Células Envolvidas na Resposta Inflamatória

Neutrófilos – Chamados também de polimorfonucleares por possuir o núcleo multilobulado. São responsáveis por responder rapidamente a estímulos, fagocitando e destruindo partículas estranhas ao organismo, como bactérias por exemplo. A interação das células endoteliais e neutrófilos é crucial no processo inflamatório agudo em resposta a invasão bacteriana e injúria tecidual (Abbas, 1996).

Mononucleares – Neste grupo de células estão presentes os macrófagos e os linfócitos, que tem como finalidade fagocitar partículas estranhas como microrganismos, macromoléculas e tecido que esteja injuriado ou morto. São capazes de sintetizar citocinas (responsáveis pelo recrutamento de outras células inflamatórias) e produzir espécies reativas do oxigênio (responsáveis pela morte de microrganismos, mas que, eventualmente, afetam tecidos normais) (Abbas, 1996).

Eosinófilos – São característicos de doenças alérgicas e infecções parasitárias. Seu papel na resposta inflamatória crônica e aguda inclui a liberação de citocinas (Weller, 1994). Em doenças alérgicas, eosinófilos estão presentes nos tecidos e fluidos e tem o papel de promover a patogênese desta doença.

Modelos Animais Utilizados Para o Estudo da Reação Inflamatória

O rato e o coelho foram durante muito tempo os animais de escolha para estudos farmacológicos do processo inflamatório. Porém a maioria dos anticorpos disponíveis para fenotipagem de células, contra citocinas e moléculas de adesão foram desenvolvidas em camundongos. Assim sendo Henriques, 1990, adaptou para camundongos a pleurisia (Spector, 1956), um modelo inflamatório clássico muito utilizado no estudo do processo inflamatório agudo e no “screening” de drogas. Consiste na indução de reação inflamatória na pleura de ratos sem excessiva manipulação, e que permite a avaliação de diversos parâmetros, como: extravasamento protéico, migração de leucócitos e envolvimento de mediadores químicos (Mikami, 1983). (Figura 15, p.81)

Desde então a pleurisia vem sendo utilizada no estudo de reações inflamatórias induzidas por diversos agentes como: carragenina (Henriques, 1990) e Lipopolissacarídeos (LPS), entre outros. Uma vez que seus mecanismos de ação ainda não estão totalmente esclarecidos, este modelo vem sendo utilizado para o estudo imunofarmacológico de produtos naturais (Souza, 1999).

Outro modelo experimental no estudo de reação inflamatória é o modelo de edema induzido na pata de ratos pela injeção de carragenina.

Pleurisia

Azul de Evans
(25 mg / Kg)

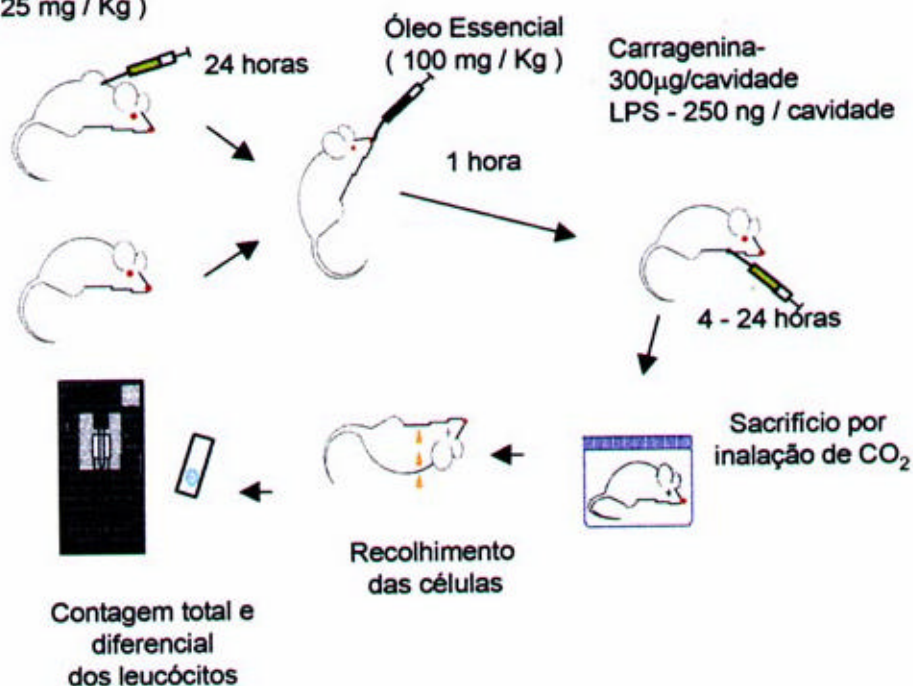


Figura 15: Processo de indução de pleurisia em camundongos, que permite a avaliação diversos parâmetros, como: extravasamento protéico, migração de leucócitos e envolvimento de mediadores químicos.

Leishmaniose

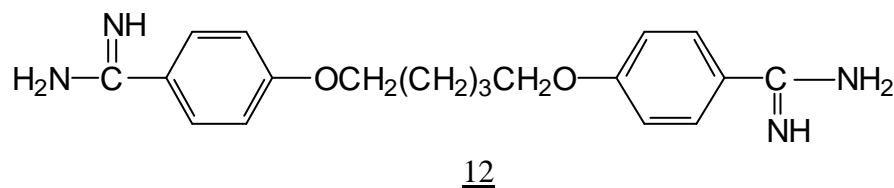
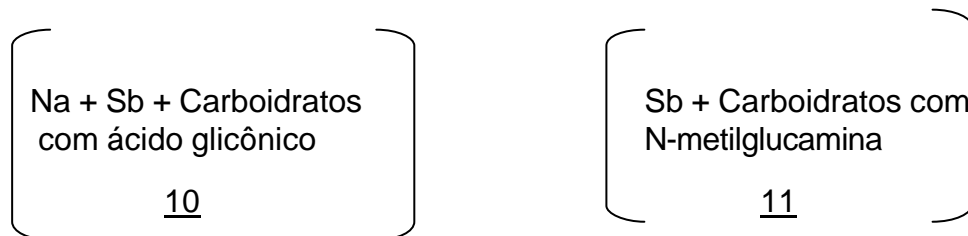
As leishmanioses são infecções causadas por parasitas distintos. É uma doença endêmica distribuída em áreas tropicais e subtropicais sendo que mais de 15 milhões de indivíduos estão infectados com 400.000 novos casos por ano. A endemia é considerada como problema de saúde pública em vários países da América Latina, sendo o Brasil o que apresenta a maior incidência de *Leishmania* tegumentar e visceral (Lainson,1987).

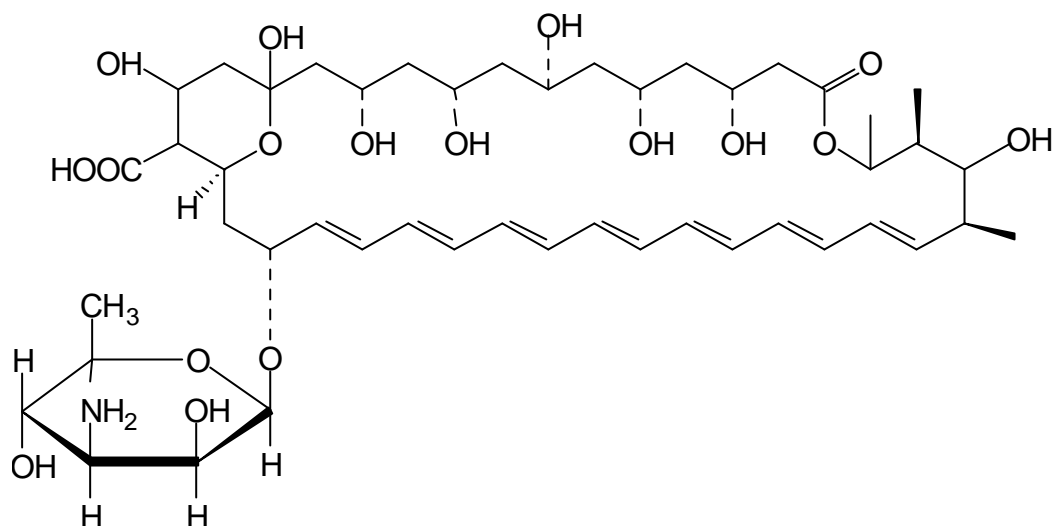
O protozoário do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) compreende um grupo biologicamente distinto de microrganismos. Na natureza todas as leishmanioses são transmitidas pela picada de flebotomíneos hematófagos infectados (Diptera: Phlebotomidae). Enquanto, algumas espécies são patogênicos para humanos, outras causam infecções apenas em mamíferos inferiores. No novo mundo, diversas ordens de mamíferos silvestres e várias espécies de vetores são envolvidos na transmissão de *Leishmania* (Lainson, 1987).

Ciclo evolutivo: O parasita apresenta duas formas no seu ciclo evolutivo: a forma flagelada denominada promastigota, móvel, com um flagelo anterior e na forma amastigota, sem flagelo. Quando inoculados no hospedeiro vertebrado pela picada do vetor (mosquito fêmea hematófaga), os promastigotas infectam os macrófagos, onde se diferenciam em amastigotas. O curso da infecção depende da natureza das respostas imunes do hospedeiro e do parasita. As diferentes formas clínicas são decorrentes da multiplicação da forma amastigota dentro do macrófago. A doença crônica em humanos, pode ser localizada (leishmaniose tegumentar) ou disseminada (leishmaniose cutânea difusa) na pele, ou evoluir com metástase para outros tecidos (leishmaniose mucosa) e órgãos (leishmaniose visceral) do hospedeiro (Grimaldi, 1991).

Alguns pesquisadores discutem sobre o controle da doença que pode ser atingido interrompendo-se o ciclo de transmissão da infecção ou com medidas de proteção do hospedeiro. Entretanto por diversos fatores, heterogeneidade populacional, diversidade biológica das Leishmanias, existência de uma quimioterapia ainda insuficiente, a falta de vacinas e outros, esse controle tem sido uma tarefa difícil (Byran, 1994).

Buscando a cura da doença diversos estudos são feitos desde a introdução empírica dos pentavalentes antimoniais, estibogliconato de sódio (Pentostam 10) e antimoniato de meglumina (Glucantime 11) há cerca de 50 anos. Outras drogas alternativas como a pentamidina 12 (4,4'-diamidinodifenoxipentano) vem sendo utilizada no tratamento das leishmanioses cutânea e visceral e a anfotericina B 13 vem sendo utilizado no tratamento das leishmanioses mucocutâneas. Substâncias imidazólicos fungicidas como cetoconazol, clotrimazol, miconazol, fluconazol e itraconazol também vêm sendo testadas na clínica de leishmaniose (Gomes, 2000).

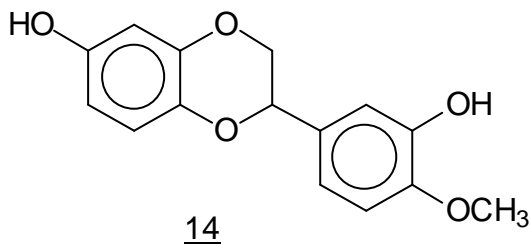




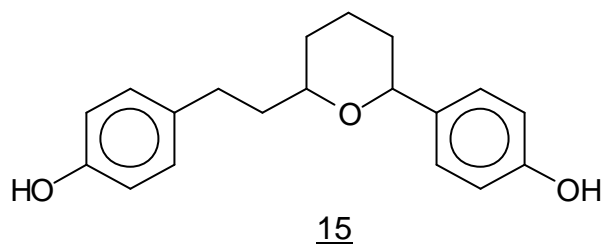
13

Existe um grande número de outros compostos mostrando atividade contra leishmanias, entretanto há uma busca de uma droga efetiva contra leishmaniose, com boa atividade e que não cause efeitos colaterais graves.

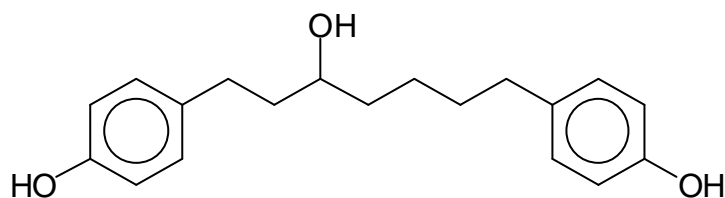
Buscando um produto natural, que possa servir como modelo para síntese de novas e mais promissoras drogas, várias plantas medicinais também são usadas para o tratamento dessa doenças. Araújo (1998) isolou compostos biologicamente ativos, os diarileptanoídes 7,3-diidroxí-4-metoxi-isoflavona 14, 2-[β -(*p*-hidroxí-fenil)-etil]-6-(*p*-hidroxífenil)-tetraidropirano 15 e o hidroxí-1,7-bis-(4'-4''-diidroxífenil)-heptano 16, de *Centolobium sclerophyllum* (Leguminosae) com atividade Leishmanicida.



14



15



16

A resposta da toxicidade aguda de uma substância é fornecida por um termo técnico chamado Dose Letal (DL), que carrega um valor numérico (DL_{50}), o qual

determina a porcentagem dos parasitas que morreram após uma quantidade específica da substância (droga).

Trypanosoma cruzi

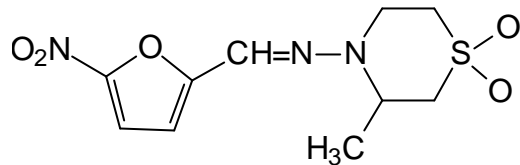
O *trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) é um protozoário que causa doença de Chagas, necessita para completar o seu ciclo evolutivo, do desenvolvimento em hospedeiros vertebrados e invertebrados. Amplamente distribuído no continente americano, desde o Sul dos Estados Unidos até a Argentina e o Chile, é considerado um dos maiores problemas dessas regiões. Estima-se 18 milhões de indivíduos infectados com *T. cruzi* em 21 países endêmicos e 100 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção, as quais correspondem a 25% dos habitantes da América Latina (Morel, 1998)

O principal mecanismo de transmissão do protozoário é o vetor contaminativo (fezes infectadas). Essa doença pode ocorrer sem a participação do inseto vetor (barbeiro), ou seja pela via congênita (placentária), transfusões e transplantes, sendo capaz de estender-se as regiões urbanas (Pessoa, 1958).

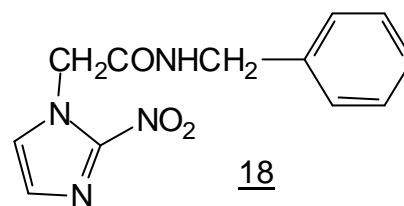
Durante seu ciclo de vida o *T. cruzi* assume diferentes tipos morfológicos e funcionais, alternando-se entre hospedeiros vertebrados e invertebrados em uma série de diferentes estágios de desenvolvimento, nos quais a forma tripomastigota ingerida pelo inseto diferencia-se na forma proliferativa epimastigota, que alcança o intestino posterior deste, diferenciando-se na forma tripomastigota metacíclica. Dentro das células do hospedeiro vertebrado, essas formas diferenciam-se na forma amastigota, a qual depois de vários ciclos reprodutivos transforma-se em tripomastigotas, forma responsável pela disseminação da infecção (Gonzalez, 1997).

No Brasil, a doença de Chagas pode ser considerada endêmica em praticamente todos os estados. O controle desta doença através da elaboração de programas, priorizou a eliminação da transmissão vetorial, por meio de inseticidas com ação residual nas habitações infectadas e a melhoria das condições de habitação (Silveira, 1994). Estima-se que 5 milhões de brasileiros possuem doença de Chagas. Uma cura para doença de Chagas é uma longa busca da medicina (WHO, 1995).

Muitas décadas se passaram desde que Chagas (1909) diagnosticou o primeiro caso desta doença. A introdução dos primeiros medicamentos, Nifurtimox 17 e o Benzonidazol 18 ocorreu no final dos anos 60 início de 70. Sabe-se que não há ação curativa na fase crônica da doença, e que a eficiência dessas drogas varia com a cepa do parasita, são drogas muito tóxicas que causam sérios efeitos colaterais. Progressos tem sido feitos no sentido de uma terapia mais racional, com a identificação e caracterização de novas substâncias (Croft, 1999).

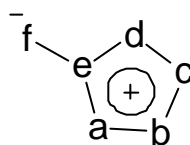


17



18

Dentro do contexto da busca por novas drogas anti-parasitárias, com maior eficácia e menor toxicidade existem duas classes de compostos sintéticos: as amidinas (compostos orgânicos caracterizados pelos grupos C=N e C-N) e os mesiônicos 19 (Compostos que possuem em sua estrutura um anel aromático heterocíclico de cinco ou seis membros, apresentando uma carga parcial positiva, balanceada por uma negativa em um grupo ou átomo exocíclico (carbono α do anel benzênico)).



19

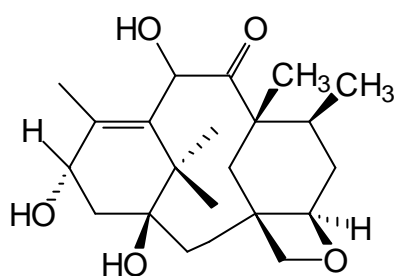
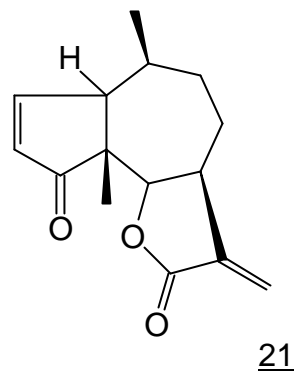
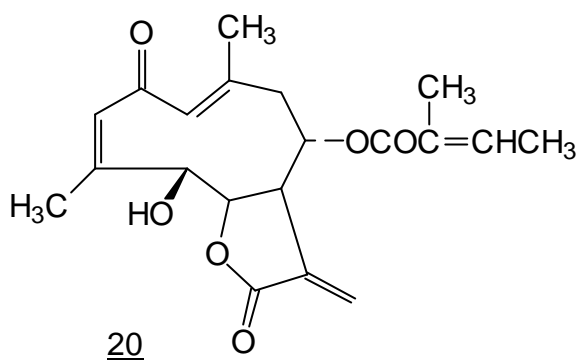
Produtos naturais podem ser fonte de novas drogas com alta atividade e baixa toxicidade. Plantas vêm sendo usada para tratamento de diferentes doenças. Recentemente foram testados, 79 extratos de diferentes famílias de plantas, contra *Trypanosoma cruzi* e *Trichomonas vaginalis* “in vitro”, onde 18 delas apresentaram atividade tripanomicida contra *Trypanosoma cruzi* forma epimastigotas (Serrano,2000).

Plantas com Atividade Antitumoral

Há muitos anos que as plantas vêm sendo usadas para o tratamento de tumores cancerígenos, porém somente a partir de 1959 é que vem sendo feito um estudo dos extratos, resinas e dos componentes isolados de algumas plantas e suas atividades contra tumores em animais. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam que 80% população mundial, principalmente nos países em desenvolvimento, utilizam plantas medicinais, como tratamento popular, para atendimento primário da saúde (Phillipson, 1994).

Existem exemplos interessantes do estudo químico de algumas plantas fornecendo uma enorme variedade de estruturas com atividade antitumoral, tais como: iridóides, alcalóides, flavonóides e outros. Esses estudos também mostram que os sesquiterpenos em sua grande maioria apresentam atividade antitumoral e citotóxica: como pôr exemplo o Molefantinina 20 extraído de *Hymenoclea salsola* (Compositae)

apresentando atividade em linhagem WM, o Ambrosina 21 extraído de *Hymenoclea salsola*, exibiu atividade na linhagem P-388 (antileucêmica, Torrance et al. 1975) e outros compostos da família dos germacrenos. Os diterpenos também vêm representando uma classe de terpenos com atividade antitumoral. O diterpeno que tem atividade significativa contra tumores metastáticos de mama é o taxol 22 obtido da casca de *Taxus brevifolia* por Wani, 1971 (Goodman, 1966).



22

Atividade Farmacológica dos Óleos Essenciais

O uso de substâncias naturais provenientes diretamente de plantas, como as essências e as fragrâncias é histórico. Há mais de seis mil anos os egípcios já conheciam o poder das substâncias aromáticas utilizadas para embalsamar seus mortos, também as citações da Bíblia relatam o uso de incensos. Esse conhecimento se expandiu ao longo dos séculos em diversas culturas e popularizou o uso de óleos essenciais (Guenther, 1952 a).

No século XIX já era conhecida a propriedade anti-séptica protetora dos óleos essenciais das plantas. O uso se fazia pela utilização de plantas inteiras ou partes específicas das mesmas (como por exemplo das flores), bem como pelo emprego de resinas e gomas naturais que exsudavam normalmente após alguma injúria causada à planta. Na mesma época surgem as primeiras pesquisas científicas sobre a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (Erickson, 1976).

O uso atual de velhas plantas de uso medicinal nos grandes centros é feito em grande parte por indústrias de extração de óleos essenciais de valor aromatizante e anti-

séptico, na conservação de alimentos industrializados, na indústria farmacêutica e de corantes.

Vários óleos essenciais, e diversas drogas contendo óleos essenciais, são empregados por exemplo, como rubefacientes, sedativos, expectorantes, diuréticos, anti-sépticos, desinfetantes, como aditivos alimentares (essências de alimentos, doces, balas, bebidas e condimentos), como essência e agentes aromatizantes de perfumes, cosméticos e produtos de uso doméstico (sabões, detergentes, desinfetantes, inseticidas e outros), na indústria farmacêutica, com fins terapêuticos ou como substâncias mascaradoras do gosto desagradável de certos medicamentos. Além disso muitos são utilizados na indústria como fonte de obtenção de terpenóides ou matéria-prima para modificação química, gerando via de regra produtos que, em última instância, serão aplicados com a finalidade de mimetizar os aromas e os sabores naturais (Sticher, 1977).

Pesquisas recentes mostram as atividades antifúngica (Pattnaik, 1997), antimalárica (Campbell, 1997) e anticonvulsivante (Souza, 1997) de óleos essenciais, mas poucas são as que exploram sua atividade antiinflamatória. Santos em 1997 mostrou uma atividade analgésica e antiinflamatória do óleo essencial de *Psidium guianense*. Siani em 1998 estudou o efeito farmacológico do óleo essencial de 5 espécies de Protium.

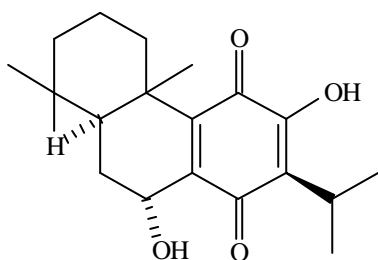
Levramento bibliográfico da correlação da composição Química e Atividade Farmacológica da espécie estudada (*Tetradenia riparia* Hochstetter Codd.), que apresenta sinônimos como: *Iboza riparia* N. E. Br , *Moschosma riparium* e *Tetradenia riparia* (Hochst) N.E.Br.).

A literatura reporta que os compostos responsáveis pelas propriedades terapêuticas da espécie (*Tetradenia riparia* Hochstetter Codd.), que apresenta sinônimos como: *Iboza riparia* N. E. Br , *Moschosma riparium* e *Tetradenia riparia* (Hochst) N.E.Br.), em grande maioria são os diterpenóides, extraídos de suas partes aéreas (folhas).

Também foram isolados dessa espécie outras substâncias tais como; sitosterol (Zelnik, 1978), esteróides, estigmasterol e campesterol (Van Puyvelde, 1981).

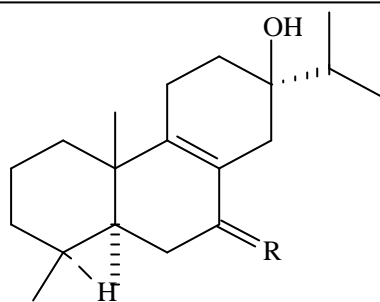
Para dar uma idéia das inúmeras atividades farmacológicas dessa espécie, descritas na literatura, relacionamos abaixo a estrutura isolada com a parte estudada.

7 α -HIDROXIOILEANONA



Com peso molecular $C_{20}H_{29}O_4$ o 7 α -hydroxyioleanona foi o primeiro diterpenóide isolado de 1100g das folhas secas de *Iboza riparia*, extraído na fração hexano C_6H_6 (1:1), seu rendimento não foi mencionado (Zelnik, 1978).

IBOZOL

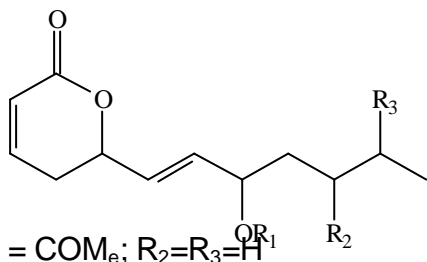


R = β -OH, H

Este diterpenóide foi extraído das folhas secas (1100g) de *Iboza riparia* com peso molecular $C_{20}H_{34}O_2$ sendo isolado na fração C_6H_6/Me_2CO (19:1) com rendimento de 13,7g.

Não possui atividade antitumoral para Leucemia linfocítica P 388 na dose de 200mg/Kg (Zelnik, 1978).

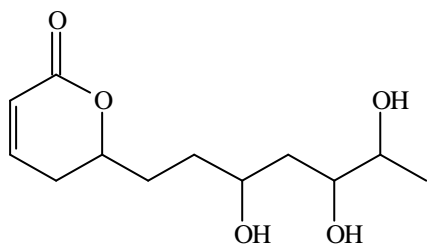
UMURAVUMBOLIDE



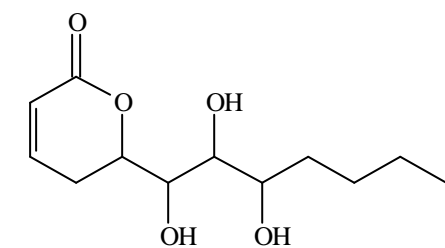
$R_1 = COM_e$; $R_2=R_3=H$

O umuravumbolide com fórmula molecular $C_{14}H_{20}O_4$ é uma α -pirona isolada das folhas secas, trituradas em pó fino, de *Iboza riparia*, extraída na fração $CHCl_3$ apresentando rendimento de 0,13% (Puyvelde, 1979).

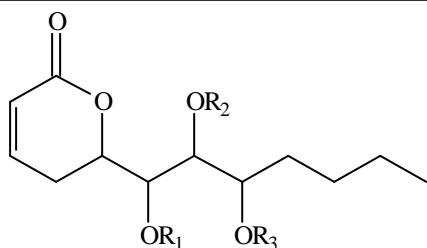
DEACETILUMURAVUMBOLIDE



DEACETILBORONOLIDE



1'2'-DIDEACETILBORONOLIDE

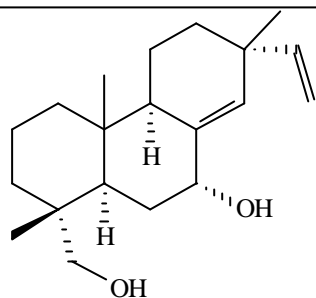


$R_1=R_2=H$; $R_3=Ac$

É também uma α -pirona de fórmula molecular $C_{12}H_{20}O_5$, isolada das folhas secas, trituradas em pó fino, de *Iboza riparia* que apresentou na fração $CHCl_3 - MeOH$ (19:1) um rendimento de 0,06% (Van Puyvelde, 1979).

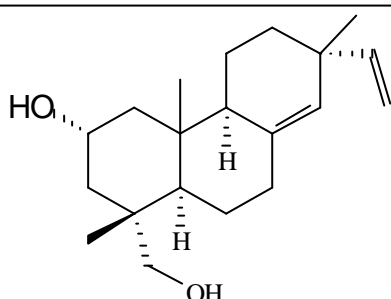
É uma α -pirona com fórmula molecular $C_{14}H_{22}O_6$ isolada das folhas secas, trituradas em pó, de *Iboza riparia*, extraído na fração $CHCl_3-MeOH$ (93:7) apresentando rendimento de 0,07% (Van Puyvelde, 1981).

8(14),15-SANDARACOPIMARADIENO-7 α ,18-DIOL



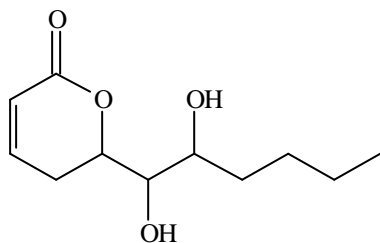
Esta substância é um diterpeno diol com fórmula molecular $C_{20}H_{32}O_2$ extraído das folhas secas de *Iboza riparia*, que apresentou 0,9% de rendimento no extrato $CHCl_3$ (De Kimbe et al, 1982). Essa substância apresentou atividades antimicrobiana para diversas bactérias gram positivas, gram negativas e alguns fungos (Van Puyvelde, 1986), antiespasmódica (Van Puyvelde, 1987) e antitrichomonas (Hakizamungu, 1988).

8(14),15-SANDARACOPIMARADIENO-2 α -DIOL



Extraído das folhas secas (522g), trituradas em pó fino, foi isolado na fração AcEtO com rendimento de 0,05%. Fórmula Molecular $C_{20}H_{32}O_2$. (Van Puyvelde, 1987).

TETRADENOLIDE



Esta é a menor α -pirona isolada no extrato clorofórmico das folhas secas de *Tetradenia riparia*, apresentou rendimento de 0,01% e Fórmula Molecular $C_{12}H_{18}O_4$. (Van Puyvelde, 1998).

TERPENOS

O óleo essencial das folhas de *Tetradenia riparia* Hochst. apresentou atividade antimalarial *in vitro* (Campbell, 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade antiinflamatória

O efeito citotóxico do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd foi avaliado através da incubação do mesmo com hemácias de carneiro durante 4 e 24 horas.

Após 4 h de incubação o óleo essencial de mirra não apresentou hemólise, no entanto apresentou uma hemólise parcial após 24 h.(Figura 16, p.91). Esse resultado foi considerado satisfatório (não causou hemólise) , podendo o óleo ser estudado para outros fins.

Inicialmente a atividade antiinflamatória do óleo essencial de mirra foi estudada através da avaliação do seu efeito sobre a produção de óxido nítrico “in vitro” após injeção intraperitoneal de tioglicolato 3%, em células da cavidade peritoneal de camundongos estimulada com LPS (30ng/mL) (Figura 21, p.95) na dose de 1µg/poço, 10 µg/poço e 100 µg/poço por 24 h. Os dados fornecidos pela Tabela 8, (p. 95) mostram o percentual de células vivas, nas concentrações citadas acima, utilizado para o cálculo do percentual de inibição. O resultado foi excelente! O óleo essencial de mirra após o período de incubação inibiu 95,89% na dose de 1 µg/poço e 99,22% na dose de 10 µg/poço.

Como já foi dito na introdução desse capítulo, após um estímulo inflamatório ocorre um extravasamento protéico. Este foi avaliado em camundongos (Swiss machos), após 1 hora da administração oral (100mg/Kg) do óleo essencial de mirra. Onde injetamos por via endovenosa Azul de Evans (0,05%), passadas 24 horas, os mesmos animais, receberam injeção intratorácica de carragenina (300µg/cavidade) e LPS (250ng/cavidade). Passadas 4 horas, da injeção de carragenina e 24 horas da injeção de LPS, os animais foram sacrificados por inalação de CO₂. A cavidade torácica foi lavada com 1 mL PBS heparinizado e o lavado foi utilizado para contagem de leucócitos totais e citoesfregaço. Os resultados obtidos demonstram que o óleo essencial de mirra não apresentou efeito inibitório sobre migração de leucócitos induzidos pela injeção intratorácica de carragenina, (Figura 18, p. 92), nem no aumento de permeabilidade vascular, demonstrada pelo azul de Evans (Figura 17, p.91). O mesmo foi observado para a atividade inflamatória induzida por LPS (Figura 19, p.93).

Deu-se prosseguimento aos testes e foi feito a atividade antiinflamatória “in vivo”, sobre o edema de pata de camundongos induzido por carragenina (300µg/pata). O teste foi realizado na pata esquerda traseira do rato, após 1 hora da administração oral (100mg/Kg) do óleo essencial de mirra. A pata direita foi o controle da reação e recebeu 50 µL de salina estéril. Após 4 horas do estímulo as patas foram levadas a um medidor digital para avaliação do edema. Nesse experimento são utilizados 10 animais/ grupo e o cálculo foi feito pela diferença de leitura do volume das patas (esquerda inflamada e direita controle). O tratamento com óleo essencial de mirra foi eficaz em inibir 56,69% do edema de pata de camundongos induzido por carragenina. (Figura 20, p.94).

Como conclusão temos que esse conjunto de testes sugere que o óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd. de Manaus, apresenta um bom resultado antiinflamatório.

AMOSTRAS

Amostras	Códigos de Envio
FA2-143	MIRRA

AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

Amostras	4hs	24hs
FA2-143	Não lise	Lise parcial

Figura 16: Avaliação citotóxica, sobre hemácias, do óleo essencial de mirra.

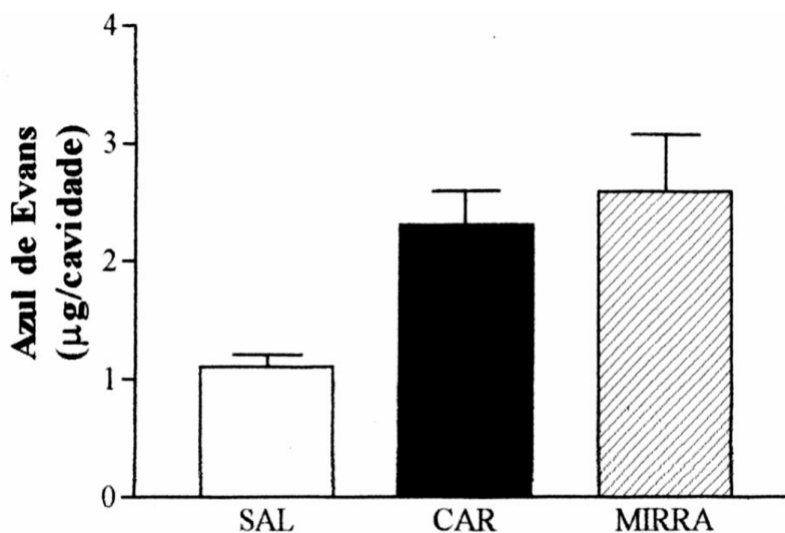


Figura 17: Efeito do pré-tratamento com o óleo essencial de mirra sobre o acúmulo de Azul de Evans induzido por carragenina em camundongos. O óleo essencial foi administrado por via oral 1 hora antes da injeção intratorácica de carragenina sendo o acúmulo de Azul de Evans (25mg/Kg) avaliado, 4h. após o estímulo, por espectrofotometro a 600 nm. O resultado foi de que o óleo essencial de mirra não apresentou efeito inibitório demonstrado pelo Azul de Evans.

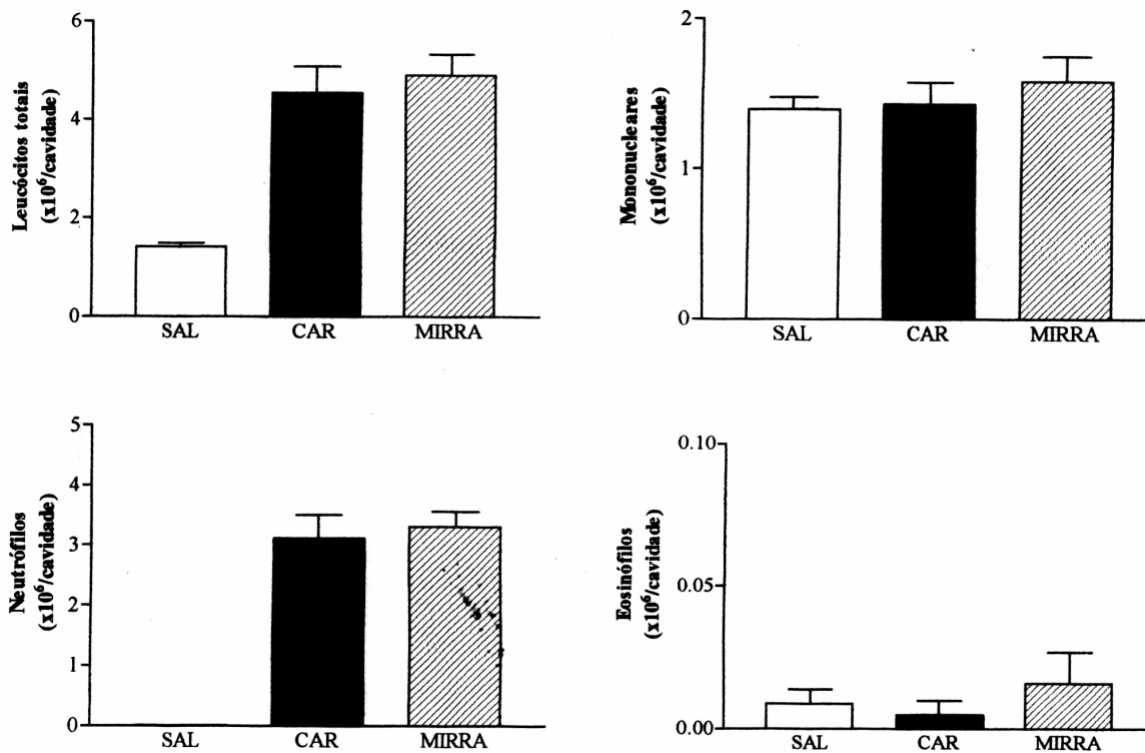
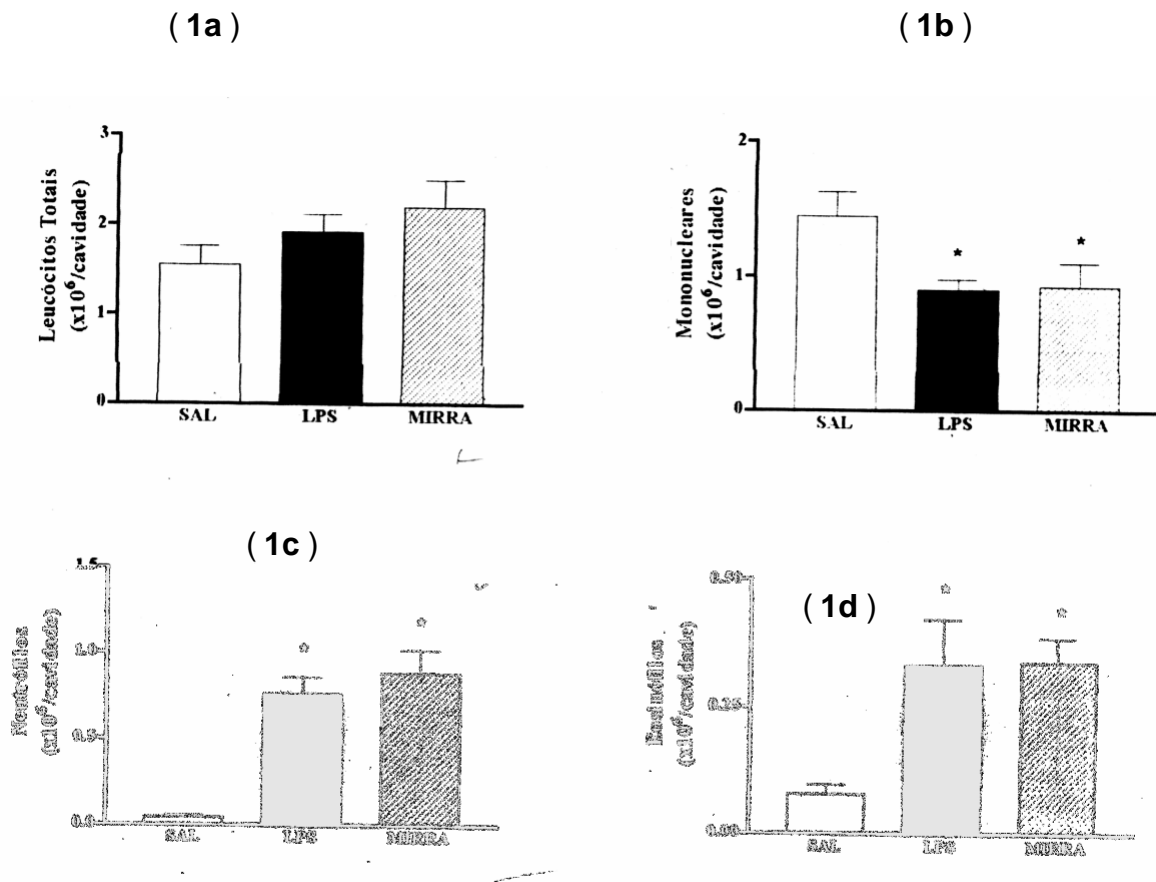


Figura 18: Efeito do pré-tratamento com o óleo essencial de mirra (100mg/Kg) na pleurisia induzida por carragenina (300 μ g/cavidade). O óleo foi administrado por via oral 1 hora antes da injeção intratorácica de carragenina, sendo o acúmulo celular avaliado 24 horas após o estímulo. O resultado foi de que o óleo essencial de mirra não apresentou efeito inibitório na pleurisia induzida por carragenina.



* $p < 0.05$ em relação a salina

Figura 19: Efeito do pré-tratamento do óleo essencial de mirra administrado oralmente na dose de 100mg/Kg, na pleurisia induzida por LPS (250ng/cavidade). O óleo foi administrado por via oral 1 hora antes da injeção intratorácica de LPS, sendo o acúmulo celular avaliado 24 horas após o estímulo. O resultado foi de que o óleo essencial de mirra não apresentou efeito inibitório na pleurisia induzida por LPS. (**1a**) Total de Leucócitos, (**1b**) Células mononucleares, (**1c**) Neutrófilos, (**1d**) Eosinófilos.

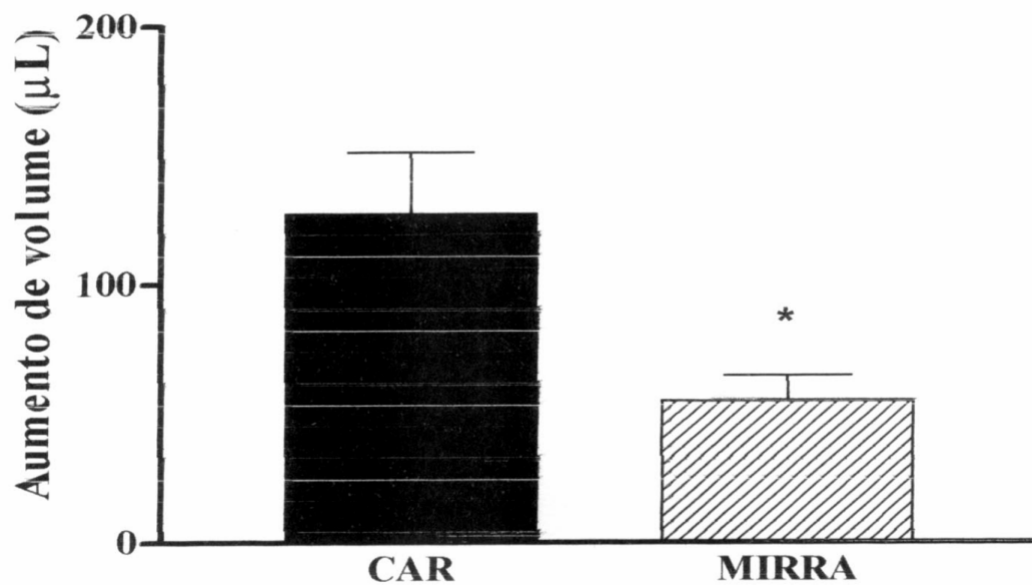


Figura 20: Efeito do pré-tratamento com óleo essencial de mirra sobre em edema de pata induzido por injeção sub-planar de carragenia (300µg/pata) na pata esquerda de camundongos. O óleo foi administrado por via oral 1 hora antes da injeção do estímulo, o aumento de volume foi avaliado 4 h. após o estímulo. O resultado foi de que o óleo essencial de mirra apresentou atividade antiinflamatória para edema de pata.

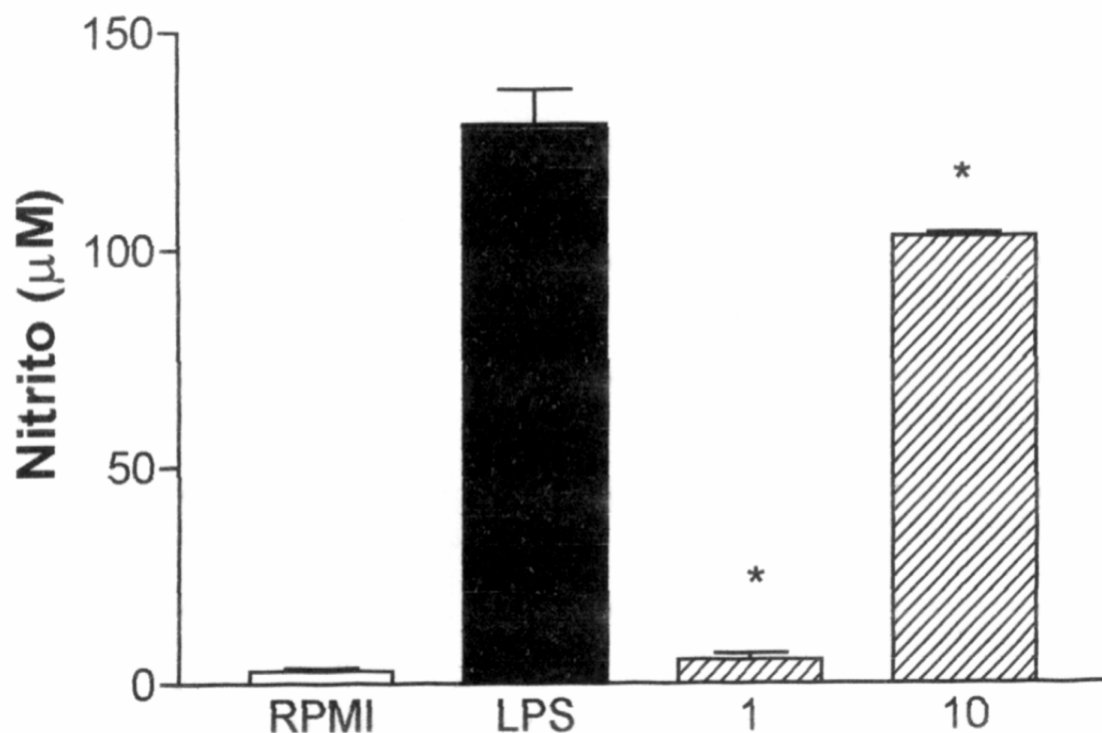


Figura 21: Efeito do óleo essencial de mirra sobre a produção de óxido nítrico, após injeção intraperitoneal de tioglicolato 3%, em células da cavidade peritoneal de camudongos estimulada com LPS (30ng/mL) nas concentrações de 1µg/poço e 10 µg/poço do óleo. O resultado foi de que o óleo essencial de mirra apresentou atividade inibitória na produção de óxido nítrico.

Controle positivo : Leitura de 1,357 (100% de células vivas)

Amostra	Leitura 3	Leitura 1	Leitura 2	% Células. vivas	Células mortas
Tween 3%	0,063	0,058	0,06	4,35	95,65
Mirra 1µg/poço	1,251	1,573	1,154	100,48	-0,48
Mirra 10µg/poço	1,446	1,369	1,407	102,28	-2,28
Mirra 100µg/poço	0,072	0,065	0,072	5,05	94,95

Tabela 8: Contagem das células no “screening” do óleo essencial de mirra, para o cálculo do seu efeito citotóxico.

Atividade antineoplásico (resultado e discussão)

Diante dos resultados positivos antiinflamatórios a pesquisadora responsável pelo laboratório de imunologia da Fundação Oswaldo Cruz Dr^a Maria das Graças Muller de Oliveira Henriques, aconselhou que fizéssemos testes antineoplásicos com o óleo de mirra.

A avaliação da atividade antineoplásica do óleo essencial de mirra foi realizada *in vitro* utilizando 7 linhagens tumorais:

- MK2 (células epiteliais de rim de macaco)
- SP2/0 (mieloma de camundongo)
- Neuro-2 A (neuroblastoma de camundongo)
- J774 (linhagem monocítica de camundongos)
- P3653 (plasmocitoma de camundongos)
- BW (timoma de camundongos)
- Carcinoma de Erlich (sarcoma induzido por metil colantreno).

Todas as linhagens foram cultivadas em placa de 96 poços (Falcon) contendo meio RPMI 1640 (Sigma) + 10% de soro bovino fetal. Após 2 horas, as células foram submetidas a tratamento em triplicata com a amostra (0,6mg/mL) ou meio de cultura encubada por 48 horas em estufa de CO₂ (5%).

Para determinar se a amostra usada foi negativa ou positiva foi utilizado ensaio colorimétrico baseado em tetrazolio MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5difênil brometo de tetrazolio). A densidade ótica foi lida em leitor de Elisa com filtro de 490nm.

Os resultados demonstraram que o óleo essencial de mirra foi capaz de inibir o crescimento celular de 5 linhagens das 7 estudadas. As linhagens estudadas e suas atividades antineoplásicas encontram-se na Tabela 9, (p.96).

Tabela 9: Resultado da avaliação da atividade antineoplásica do óleo de mirra nas 7 linhagens tumorais estudadas.

LINHAGENS	ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICO	PERCENTAGEM DE ATIVIDADE
MK2	Negativo	—
SP2/0	Positivo	86,6%
Neuro-2 A	Positivo	86,6%
J774	Negativo	—
P3653	Positivo	74,6%
BW	Positivo	82,0%
Carcinoma de Erlich	Positivo	68,48%

Atividade tripanomicida (resultado e discussão)

Para o teste de avaliação da atividade antileishmania foi necessário a diluição do óleo essencial de mirra (10,0 mg) em DMSO (1mL), na concentração até 1,6% a qual não é lesivo para o parasita.

Manutenção “in vitro”

O primeiro procedimento foi a preparação da solução de LIT (meio de cultura com os parasitas). O meio foi feito com 1mL de sangue de coelho contaminada com parasitas e 2 mL de LIT.

Teste de atividade antileishmania

Após 4 dias de cultivo para o desenvolvimento do parasita temos uma concentração aproximada de 12×10^6 parasitas/ mL. A concentração parasitaria foi ajustada para 4×10^6 parasitas/ mL.

O teste de atividade antileishmania “*in vitro*” foi realizado em placa de cultura de 96 poços. O óleo essencial de mirra foi usado na faixa de concentração de 320 $\mu\text{g/mL}$ a 5 $\mu\text{g/mL}$, a concentração parasitária foi mantida em todos os poços (4×10^6).

Após ajustado o valor da solução de parasitas, colocou-se 180 μL de meio de cultura (LIT) nos 8 primeiros poços da placa de teste e 90 μL nos demais (88 poços). Foram desprezadas dos primeiros 8 poços alíquotas de 11,5 μL . Adicionou-se a estes uma alíquota de 11,5 μL da solução do óleo de mirra em DMSO (dimetilsufóxido). Todos os poços da placa de teste foram homogeneizados. Foram então retirados 90 μL da primeira fileira da placa de teste e adicionado a próxima fileira, esse procedimento é feito sucessivamente até a última fileira onde o volume é descartado. O controle é feito em seis poços contendo DMSO e o parasita sem o óleo de mirra.

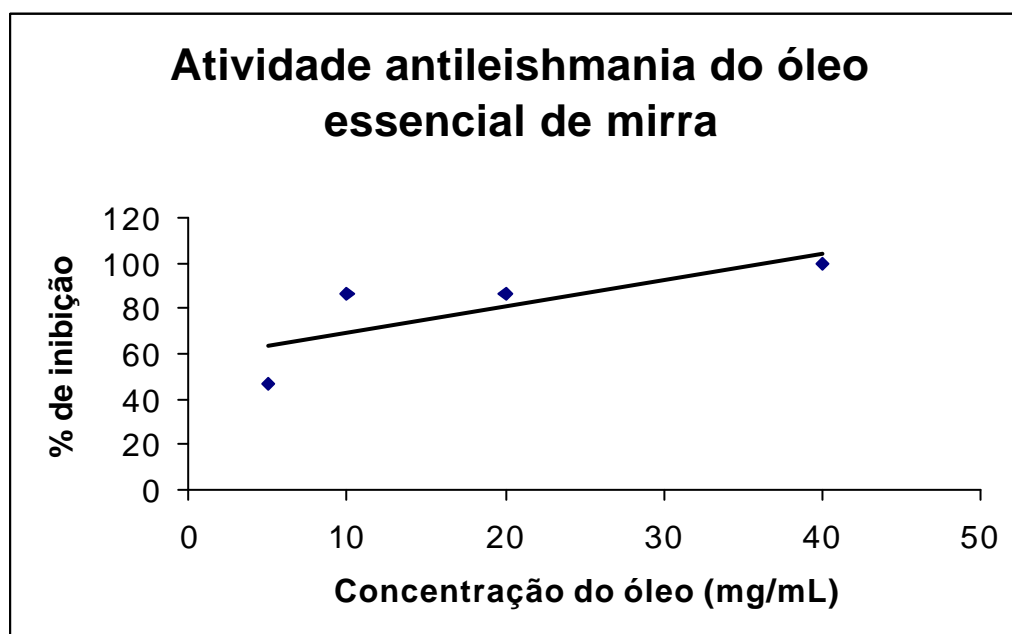
Essas diluições resultaram nas concentrações de 320 $\mu\text{g/mL}$, 160 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$. Após 24 horas de incubação a 26° C os parasitas foram contados em câmara de Neubauer . O percentual de inibição foi determinado comparando-se com a cultura controle.

Esse experimento foi feito em triplicata e repetido duas vezes.

Tabela 10: Dados experimentais do ensaio “in vitro” da atividade antileishmania (promastigotas) do óleo essencial de mirra, para obtenção da dose letal (DL₅₀).

Concentração do óleo essencial de mirra (µg/mL)	% de inibição de parasitas
320	100
160	100
80	100
40	100
20	86.2
10	86.2
5	46.8

O resultado obtido foi de que o óleo essencial de mirra apresentou boa atividade antileishmania contra a forma promastigota (*Leishmania amazonensis*), com DL 50 = 0,47 mg/mL (figura-22), que corresponde ao teste onde, a percentagem de inibição do óleo foi considerada de 100% para as concentrações altas (320µg/mL a 40µg/mL). (Tabela 10, acima).



% Inibição = -32,949 + 36,405 Ln(x), coeficiente de correlação: r = 0,95, DL50 = 0,47 mg/mL

Figura22: Gráfico e equação para determinação da dose letal (que inibe 50% do crescimento celular) do óleo essencial de mirra.

O DL₅₀ encontrado na atividade antileishmania do óleo essencial de mirra, para a cepa, desta espécie é valido para 24h, nestas condições de trabalho. O resultado foi de que o nosso óleo mostrou-se ativo contra *Leishmania Amazonensis*.

Atividade tripanomicida em *Trypanosoma cruzi* (resultado e discussão)

Formas tripomastigotas (10⁶ parasitas/mL) de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, obtidas a partir de cultura em linhagem celular MK2 (células epitaliais de rim de macaco) foram distribuídas em placa de teste de 96 poços. A cada poço foi adicionado o óleo essencial de mirra na concentração de 0,6 mg/mL. Após 24 horas de incubação a 37°C em estufa com 5% de CO₂ o número de parasitas viáveis foi contado em hemocitômetro.

O experimento continha um controle positivo com cristal violeta a 0,2% e um controle negativo. Os resultados demonstram que o óleo essencial de mirra apresentou atividade tripanosomicida de 100%.

EXPERIMENTAL DO CAPÍTULO II

Animais

Foram utilizados camundongos, das linhagens Balb/c e Swiss, machos, pesando entre 18 e 25 gramas fornecidos pelo Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram mantidos em períodos de claro e escuro, alternados de 12 em 12 horas, condições controladas de temperatura, tendo livre acesso a água e ração.

Pleurisia induzida por Lipopolissacarídeos (LPS) e carragenina

A pleurisia foi induzida através de injeção intratorácica (*i.t.*) LPS (250ng/cavidade) ou carragenina (300µg/cavidade) em 100µL por cavidade. Um grupo experimental recebeu igual volume de solução salina estéril livre de pirógeno para fins de controle. O estímulo foi injetado, no espaço intercostal do lado direito dos camundongos, através de uma agulha (13 x 7 gauge) adaptada por um cursor de plástico para garantir a inoculação dos indutores na cavidade pleural do animal, sem atingir o pulmão.

Após 4 horas, da injeção de carragenina e 24 horas da injeção de LPS, os animais foram sacrificados por inalação de CO₂. A cavidade torácica foi acessada através de uma pequena incisão no diafragma e lavada com 1mL “Phosphate Buffered Saline” (PBS) heparinizado (40 UI/mL).

Quantificação do extravasamento protéico

Para a avaliação do acúmulo protéico, induzido por carragenina, foi utilizada a técnica do extravasamento de Azul de Evans. Para tanto os animais, 24h antes da injeção intratorácica (*i.t.*) de carragenina (300µg/cavidade em 100µL), receberam uma injeção endovenosa de Azul de Evans (25mg/Kg) visando sua ligação á albumina plasmática, possibilitando a quantificação colorimétrica do extravasamento protéico para a cavidade pleural. Um grupo experimental recebeu igual volume de Azul de Evans, bem como salina estéril *i.t.*, para fins de controle. Após 4 horas, os animais foram sacrificados por inalação de CO₂ e suas cavidades foram lavadas com 1mL de PBS heparinizado (40UI/mL).

O fluído recolhido da cavidade pleural de camundongos inoculados com carragenina e previamente injetados com Azul de Evans 0,05% por via endovenosa, foi centrifugado a 3500 RPM durante 10 minutos. Foram recolhidos 200µL do sobrenadante e colocados em um poço de uma placa de cultura de 96 poços, de maneira que cada poço correspondesse ao lavado pleural de um camundongo. Em seguida a placa foi levada para leitura da absorbância a 600 nm em leitor de microplacas (BIORAD).

Contagem de leucócitos

A contagem do número total de leucócitos na cavidade foi feita diluindo-se uma alíquota do lavado pleural em isoton II (1:200), e a análise realizada em contador automático (COULTER Z1).

A contagem diferencial de leucócitos (neutrófilos, células mononucleares e eosinófilos) foi realizada com esfregaços preparados em citocentrífuga (Shandon) corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa e avaliados em microscópio sob objetiva de imersão (100x; Olympus, Japão).

Os resultados foram expressos como número de leucócitos ($\times 10^6$) por cavidade.

Tratamento com o óleo essencial

O óleo essencial foi diluído em tween 20 (1 μ L para cada 1mg de óleo essencial) e água filtrada, e administrado oralmente na dose de 100mg/Kg, num volume final de 200 μ L, 1 hora antes da injeção do estímulo.

Edema de pata

O edema de pata foi induzido por injeção sub-plantar (agulha 13x3 gague) de carragenina (300 μ g/pata) na pata esquerda traseira. A pata direita foi o controle da reação, recebendo o mesmo volume (50 μ L) de solução salina estéril. O edema foi avaliado em pletismografo digital (Ugo Basile, Itália), 4 horas após o estímulo. O edema, expresso em μ L, foi calculado através da seguinte fórmula:

Edema = volume da pata esquerda – volume da pata direita

Ensaio de produção de óxido nítrico

Camundongos Balb/c receberam 1 mL de injeção intraperitoneal de tioglicolato 3%, 96 horas antes de serem sacrificados e terem a cavidade peritoneal lavada com 5 mL de RPMI –1640 puro estéril. O lavado foi centrifugado por 10 min à 1500 rpm e seu sobrenadante desprezado. O “pellet” foi ressuspensão em 1 mL de RPMI contendo 10% soro fetal bovino e antibiótico (gentamicina 25 μ g/mL) e desta suspensão foi retirada uma alíquota de 50 μ L que foi diluída em Azul de Tripán, para contagem do número de células viáveis. Depois de contadas, foram distribuídas 2×10^5 células por poço em placa de 96 poços e levadas a estufa contendo 5% CO₂ à 37°C por 30 min. Após este tempo, o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se meio rico em interferon, LPS (30ng/mL) e o óleo essencial (100 μ g/ poço). Após 24 horas a placa foi centrifugada a 1500 rpm durante 4 minutos e 100 μ L do sobrenadante foi recolhido e transferido para outra placa de 96 poços. Foi adicionado igual volume do reagente de Greiss, permitindo a revelação da reação através de um leitor de microplaca (BIORAD) utilizando filtro de 540nm.

Ensaio de citotoxicidade

Camundongos Balb/c foram sacrificados e tiveram a cavidade peritoneal lavada com 5 mL de RPMI puro estéril. O lavado foi centrifugado por 10 min a 1500 rpm e seu sobrenadante desprezado. O “pellet” foi ressuspensão em 1 mL de RPMI contendo 10% soro fetal bovino e antibiótico (gentamicina 25µg/mL) e desta suspensão foi retirada uma alíquota de 10µL que foi diluída em Azul de Tripán, para contagem do número de células viáveis. Depois de contadas, foram distribuídas 2×10^5 células por poço em placa de 96 poços e levadas a estufa contendo 5% CO₂ à 37°C por 30 min. Após este tempo, o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se os compostos (100µg/poço) em volume final de 200µL de RPMI completo. Após 20 horas foi adicionado 22,5µL de MTT { 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5difênil brometo de tetrazolol } (5mg/mL) a cada poço. Decorridas 4 horas a placa foi centrifugada (1500 rpm por 4 min.), o sobrenadante desprezado, e a cada poço foi adicionado 150µL de DMSO. Após solubilização dos cristais formados a leitura da densidade óptica (D.O.) foi feita em leitor de microplaca (BIORAD) utilizando filtro de 490nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis, tendo como padrão de 100% de viabilidade as células cultivadas apenas com meio de cultura (controle), utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{D.O. da amostra} \times 100}{\text{D.O. do controle}}$$

Foram consideradas amostras com atividade citotóxica as que apresentaram uma porcentagem de viabilidade inferior a 95%.

Reagentes

Os seguintes reagentes foram utilizados: azul de Tripán, lipopolissacarídeo (*E. coli* sorotipo 055-B5), N-(1-naftil)etilenodiamina, ovoalbumina, PBS, sulfanilamida, tioglicolato, tween20, zimosan (Sigma -USA); giemsa, May-Grunwald, (Merck-Alemanha); soro bovino fetal clone III (HyClone-USA); isoton II, zap-oglobin (Coulter-USA); heparina (Roche-USA); solução de salina estéril.

Preparo de drogas e soluções

RPMI completo

O meio de cultura RPMI 1640 foi feito seguindo as instruções do fabricante. Para uso, foram adicionados os seguintes complementos

Reagente de Greiss

Solução A

Sulfanilamida		1 g
---------------	--	-----

Completar para 100ml com H₃PO₄ a 5%.

Solução B

N-(1-naftil)etilenodiamina		100mg
----------------------------	--	-------

Completar para 100ml com H₂O.

Imediatamente antes do uso as duas soluções foram misturadas em volumes iguais.

Tioglicolato

Diluir 3 g de meio de cultura tioglicolato em 100mL de água fervente. Em seguida, a solução foi levada a autoclave por 30 minutos a 120°C.

Experimental da atividade tripanomicida de *Leishmania amazonensis*

Cepa–*Leishmania amazonensis* (*L.amazonensis*) (MHOM/BR/77/LTBOO16) previamente caracterizada através do perfil de restrição do DNA do cinetoplasto (Gonçalves, 1984), eletroforese de isoenzimas (Momen, 1984) e radioimuno ensaio (RIA) usando anticorpos monoclonaes específicos (Mac MahonPratt e Cols, 1984), Esta cepa foi cedida pelo Departamento de Ultraestrutura e Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz.

As formas promastigotas de *L. amazonensis*, obtida a partir de amastigotas isoladas de lesões de camundongos infectados, foram mantidas através de passagens semanais consecutivas a 26°C em estufa incubadora de BOD (Fanem S/A Brasil), utilizando-se meio de cultura bifásico. Como fase sólida foi usado o meio NNN (meio de NOVY, Mac Neal & Nicolle), constituído de Agar com 15 % de sangue desfribinado de coelho e com fase líquida meio Schneider (Schneider`s Insect Medium, Sigma Cell Culture, St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) estéril (Sigma Cell Culture, St. Louis, MO, USA), acrescido de 100U/mL de penicilina G potássica e 100 µg/mL de estreptomicina (Laboratório Wyenth LTDA, São Bernardo do Campo, S.P., Brasil).

Os experimentos com a população de promastigotas de *L. amazonensis*, contendo alto percentual de formas metacíclicas com a forma mantida por até 5 repiques consecutivos.

A dose letal em 50% (concentração que inibi o crescimento celular), foi calculada com a equação da reta obtida por regressão linear dos valores do Log da concentração do óleo essencial versus o percentual de parasitas vivos em cada faixa de concentração.

CONCLUSÃO

Na análise por cromatografia gasosa de alta resolução com detetor seletivo de massas do óleo essencial de mirra, em coluna polar identificou-se 22 substâncias, ficando evidente que a maior dificuldade de identificação está relacionada a reprodutibilidade dos índices de retenção.

A extração por micro-extração em fase sólida, mostrou-se tão eficiente quanto a técnica de extração por coação para a determinação dos constituintes voláteis do óleo essencial de mirra.

O programa de deconvolução de espectros de massas, permitiu com confiabilidade, a identificação de substâncias co-eluídas, e em baixíssimas concentrações, aumentando o número de substâncias identificadas, no óleo essencial de mirra obtido através das técnicas de coação e microextração em fase sólida, de 66 para 115 constituintes.

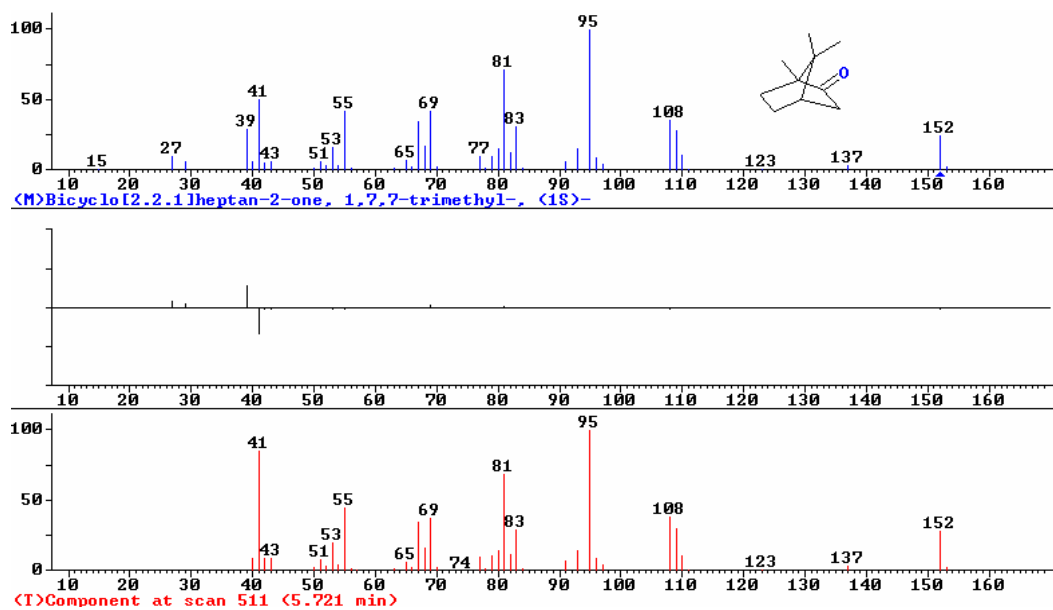
O óleo essencial das folhas de mirra mostrou-se não citotóxico, sem atividade inflamatória para os testes de pleurisia induzida por carragenina “in vivo”, e extravasamento protéico. Em contra partida, apresentou 56,69% de atividade antiinflamatória no edema de pata de camundongo “in vivo”, e de 95,98% na dose de 1µg/poço e 99,22% na dose de 10 µg/poço sobre a produção de óxido nítrico “in vitro”.

Atividade antineoplásica em 5 linhagens tumorais, atividade tripanomicida para *Leishmania Amazonensis* forma promastigota, com LD₅₀ = 0,47 mg/mL. e *Trypanosoma cruzi* de 100% na dose de 0,06 mg/mL.

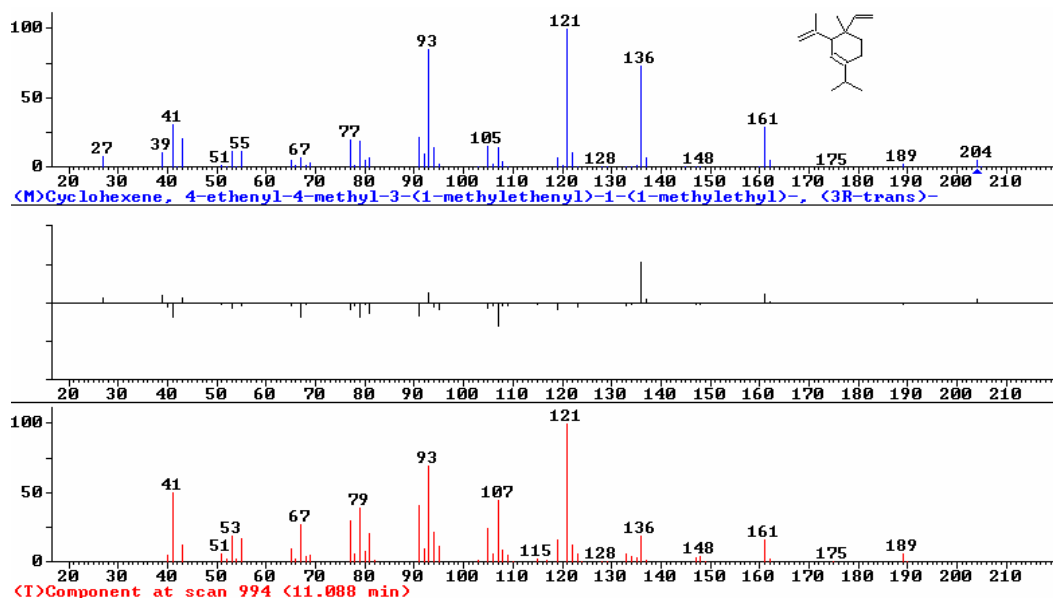
Esses resultados foram excelentes e animou a todos que trabalharam nos testes de atividades, sugerindo um estudo contínuo de atividades biológicas.

ANEXO

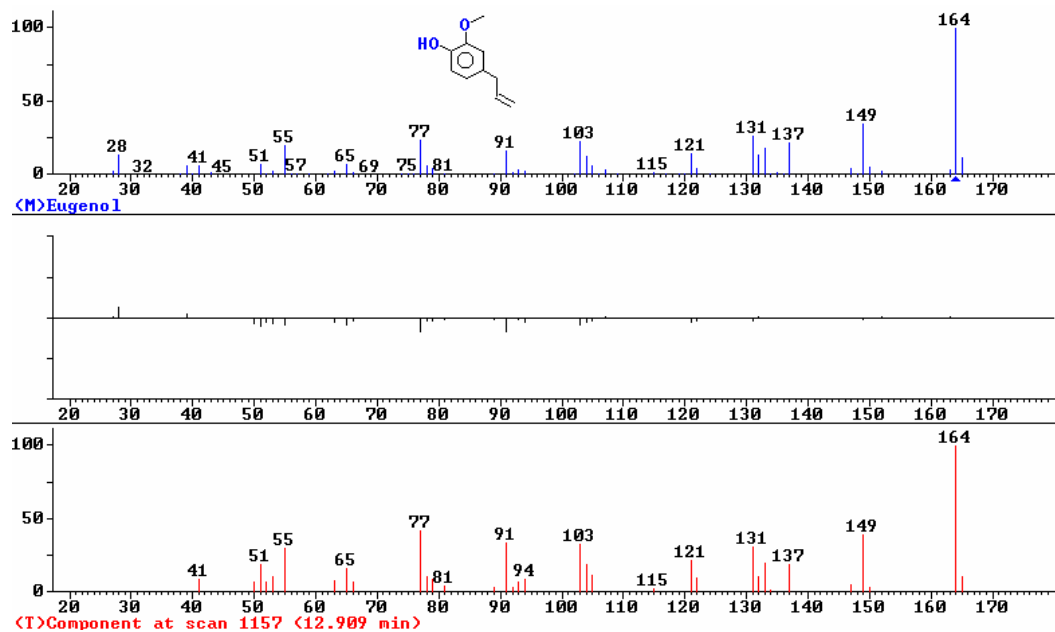
Exemplos de algumas substâncias identificadas pelo IRR e a espectroteca “NIST”, substâncias não identificadas pelo IRR porém comparadas com a espectroteca “NIST”, identificadas no óleo Essencial de mirra.



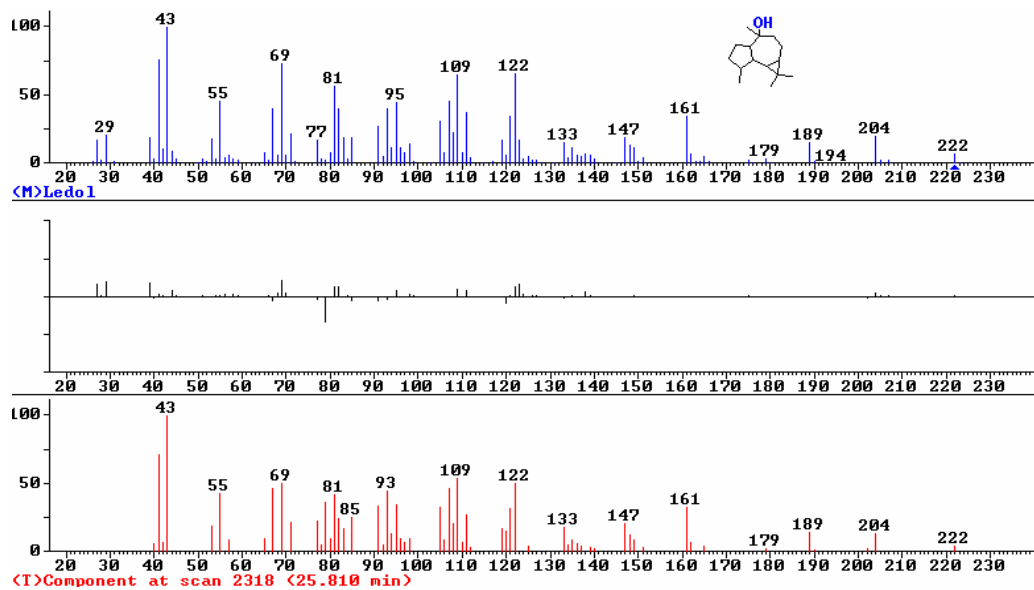
Espectro de massa $t_R = 5,721$ min. cânfora IRR 1144 (tabela-7, p.71)



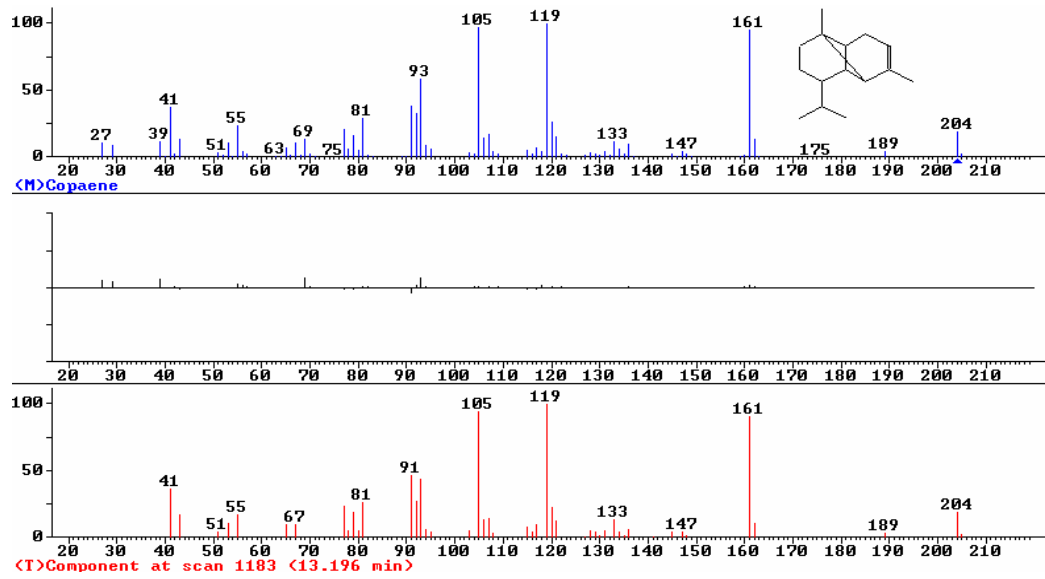
Espectro de massas t_R 11.00 min. δ -elemeno IRR 1339 (Tabela-7, p.72)



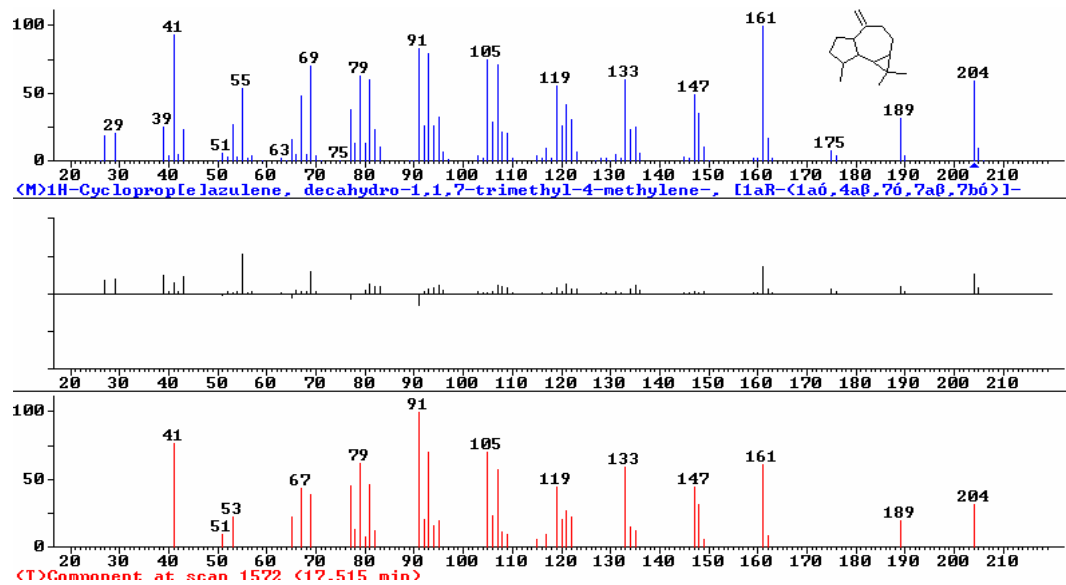
Espectro de massas t_R 12,909 min. eugenol IRR 1356 (Tabela-7, p.72)



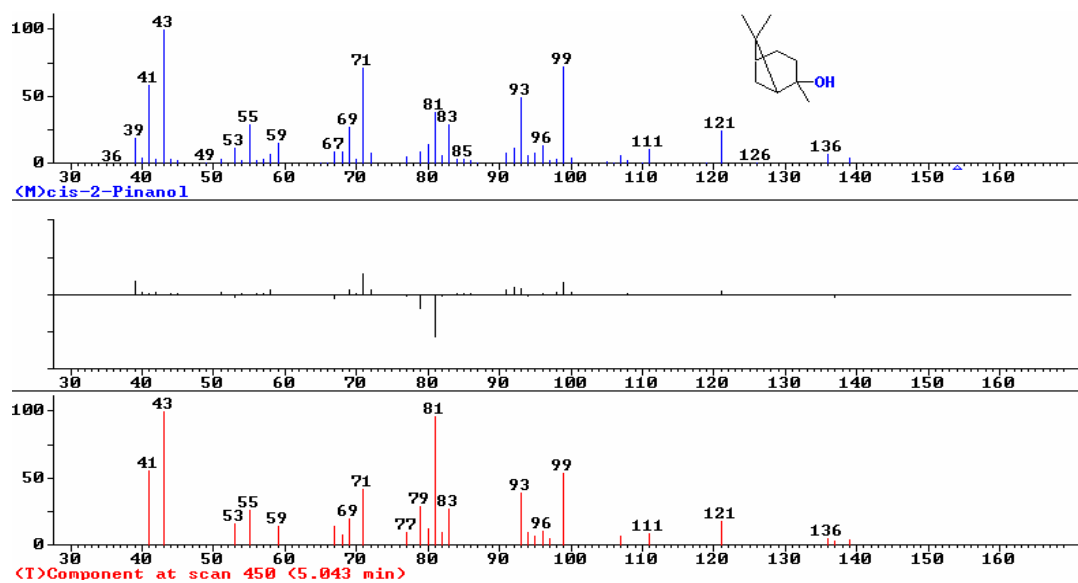
Espectro de massas t_R 25,818 min. ledol, IRR 1566 (Tabela7, p.73)



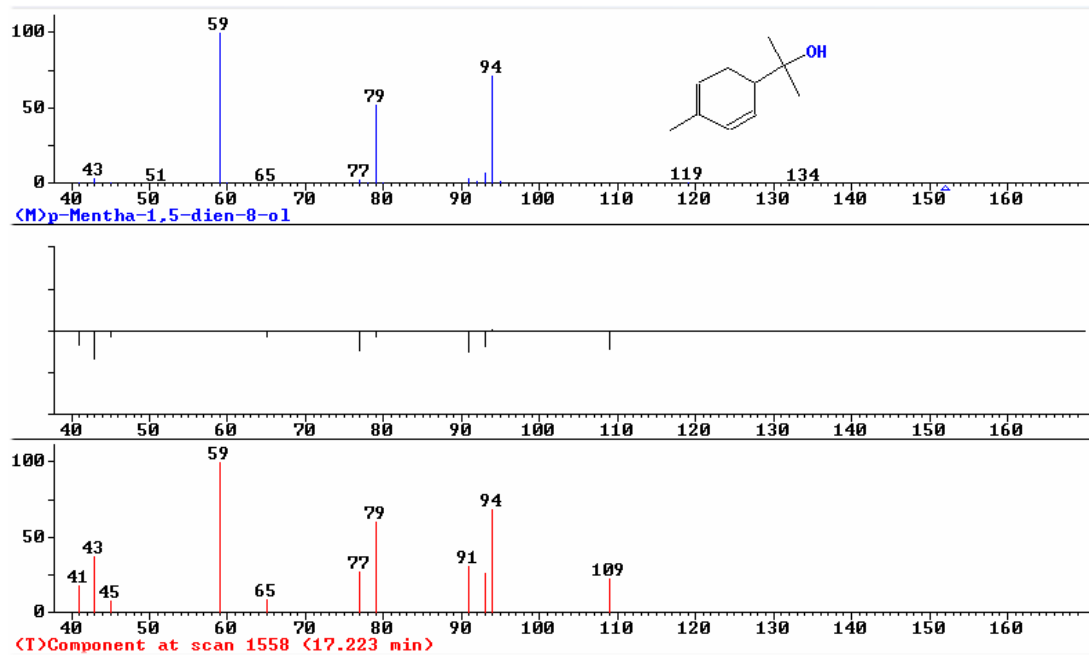
Espectro de massas t_R 13,196 min. α -copaeno IRR 1376 (Tabela7, p.72)



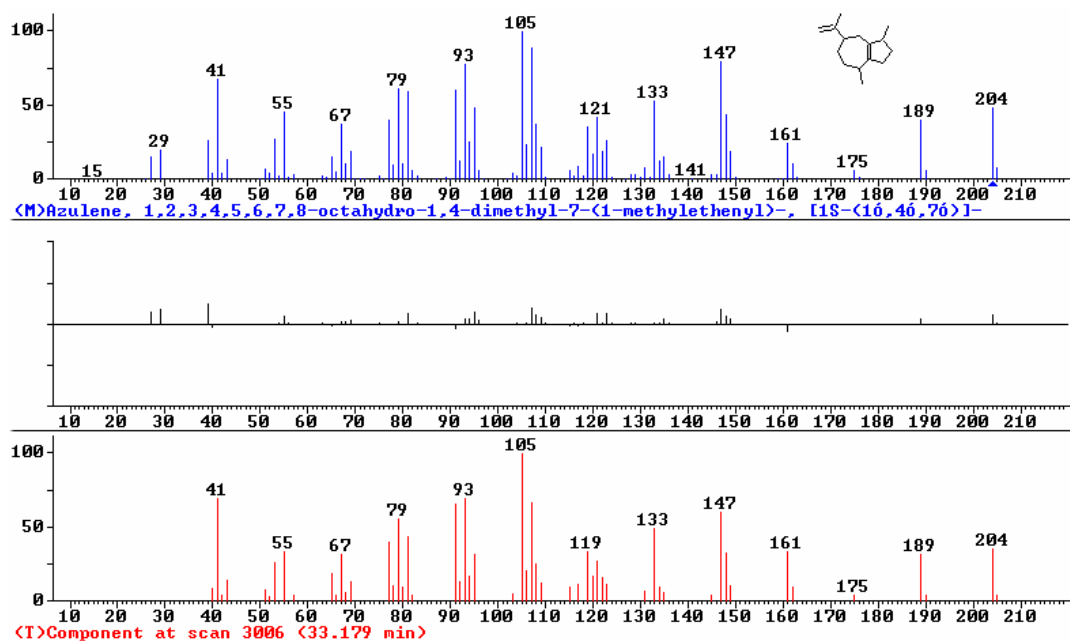
Espectro de massas t_R 17,515 min. *allo*-aromadendreno IRR 1462 (Tabela7, p.72)



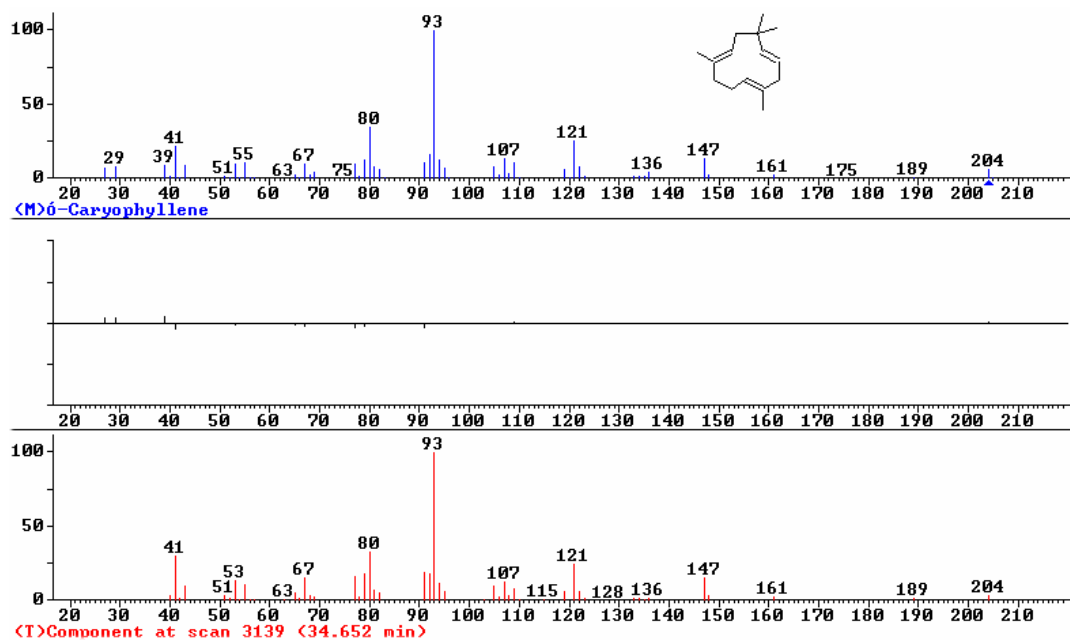
Espectro de massas t_R 5,043 min. (E)-pinanol-2 IRR 1119 (Tabela-7,p.71)



Espectro de massas t_R 17,223 min. *p*-menta-1,5-dienoll-8 IRR 1167 (Tabela-7,p72.)



Espectro de massas t_R 33,179 min. α -guaieno IRR 1439 (tabela-7, p.72)



Espectro de massas t_R 34,652 min. α -humuleno IRR 1454 (tabela-7, p. 72)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, K.A.; LICHTMAN, A.H.; POEBER, J.S. **Cellular and Molecular Immunology**, 3^a. ed., W. B. Saunders Company, 1996. p. 136-139.

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography /mass spectroscopy**. Allured Pub., Carol Stream, IL, 1997.

ANALYTICAL METHODS, COMMITTEE, Part XII, *Analyst*. 112, p.1315-1318, 1987.

ANALYTICAL METHODS, COMMITTEE, Part XIII, *Analyst*. 113, p.657-659, 1988.

ANALYTICAL METHODS, COMMITTEE, Part XIV, *Analyst*. 113, p.1125-1136, 1988.

ANALYTICAL METHODS, COMMITTEE, Part XV, *Analyst*. 115, p.459-463, 1990.

ANALYTICAL METHODS, COMMITTEE, Part XVI, *Analyst*. 118, p.1089-1098, 1993.

ANALYTICAL METHODS, COMMITTEE, Part XVII, *Analyst*. 122, p.1167-1174, 1997.

ARAÚJO, C.A.C.; ALEGRIO, L.V. & LEON, L.L. **Phytochemistry**. 49 (3) 751-754, 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 5785**: Método de ensaio de determinação de índice de refração em óleos essenciais; Rio de Janeiro: 1985.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 5783**: Método de ensaio de determinação de rotação óptica em óleos essenciais; Rio de Janeiro: 1987.

AUORE, A.G.; ABAUL, J.; BOURGEOIS, P. **J. Essent. Oil Res.**, 10, p.161-164, 1998.

BARROSO, G.M. Sistemática de Angiospermas do Brasil, Viçosa: **Universidade Federal de Viçosa**, 3, p.98-118, 1986.

BRYAN, R.T.; BALDERRANA, F.; TONM, R.J. *et al.* **Am. J. Trop. Med. Hyg.** p.50 – 61, 1994.

CAMPBELL, W.E.; GAMMON, D.W.; SMITH, P.; ABRAHAMS, M.; PURVES, T.D. **Planta Medica**, 63, p.272-274, 1997.

CANTO-CAVALHEIRO, M.M.; ECHEVARRIA, A.; ARAUJO, C.A.C.; BRAVO, M.F.; SANTOS, L.H.S.; JANSEN, A.M.; LEON, L. L. **Microbios**, 90, p.51-60. (1997):

- CHAGAS, C. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1 p.159-218, 1909.
- CHAGNON, M. Inventaire Pharmacologique. **Journal of Ethnopharmacology** 12, p.239-251, 1984.
- CHALCHAT, J.C.; GARRY, R.P.; MENUT, C.; LAMATY, G.; MALHURET, R.; CHOPINEAU, J. **J. Essent. Oil Res.**, 9, p.67-75, 1997.
- COELHO DE SOUZA, G.P.; ELISABETSKY, E.; NUNES, D.S.; RABELO, S.K.L.; NASCIMENTO DA SILVA, M. **J. Ethnopharmacology**, 58, p.175-18, 1997.
- COLBY, B.N. **Am Soc Mass Spectrum**, 3, p.558-562, 1992.
- Connolly, J.D.; Hill, R.A. **Dictionary Terpenoids** : v. 1 Chapman & Hall London: New York. 1991.
- CORDELL, G.A. **New Natural Products and Plants Drugs WithnPharmacological, Biological or Therapeutical Activity**. H. Wagner and P. Wolff,(Ed.) New York, p.57-59, 1977.
- CRAVEIRO, A.A.; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L. **Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste**. Fortaleza: UFC, p.63, 1981.
- CRAWFORD, L.R.; MORRISON, J.D. **Anal. Chem.**, 10, p.1464-1469, 1968.
- CROFT, S. **Mem. Int. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 94 (2), p.215-220, 1999.
- DAVIES-COLEMAN, M.T.; RIVETT, D.E.A. **Phytochemistry**, 38, p.791-792, 1995.
- DE KIMBE, N.; SCHAMP, N.; VAN PUYVELDE, L.; DUBE, S.; CHAGNON-DUBÉ, M.; BORREMANNS, F.; ANTEUNIS, M.J.O. **J. Org. Chem.**, 47, p.3628-3630, 1982.
- DUARTE, A.A. **Dissertação de mestrado**, UFRRJ, 1997
- DROMEY, R.G.; STEFIK, M.J.; RINDFLEISCH, T.C.; DUFFIELD, A.M. **Phytochemistry**, 48 (9), p.1368-1375, 1976.
- DUBE, S.; UPADHYAY, P.D.; TRIPATHI, S.C. **Can. J. Bot.**, 67, (7), p.2085-2087. 1989.
- DUFFIELD, A.M.; ROBERTSON, A.V.; DJERASSI, C.; BUCHANAN, B.G.; SUTHERLAND, G.L. **J. Amer. Soc.**, 91, p.2977, 1969.
- DUNKEL, F.V.; SERUGENDO, A.; BREENE, W.M. & SRIHARAN, S. **Plant Foods for Human Nutrition**, 48, p.1-16, 1995.
- ELARAKI. A.T.; LATTAOUI, N.; ERRIFI, A. **J. Essent. Oil Res.**, 5, p.45-53, 1993.

- ERICKSON, R.E. *Lloyia*, 39 (1), p. 8-20, 1976
- ETTRE, S. *Chromatographia*, 6, 11, p.489-495, 1973.
- ETTRE, S. *Chromatographia*, 7, 11, p.39-46, 1974.
- FENNEMA, O. R., KAREL, M., SANDERSON, W.G., TANNENBAUM, R. S., WALSTRA, P., WHITAKER, R. J. **Techniques for Analyzing Food Aroma**, Ray Marsili, Marcel Dekker (Ed.), Inc. New York, Basel, Hong Kong, p.81-112, 1997.
- GODOY, R.L.O.; KOKETSU, M.; LIMPE, S.; LOPES, D.; SÁ SOBRINHO, A.F.; TORQUILHO, H. S. **J. Essent. Oil Res.**, 11, p.321-323, 1999.
- GOMES, D.C.F. **Dissertação de Doutorado**, UFRRJ, 2000.
- GONÇALVES A.M.; NEHME N.S.; NOREL, C.M. **Programe for Research and training in Tropical disease**, Finep, CNPq, Fiocruz, 2 (1), p.95-109, 1984.
- GONZALEZ, A.G.; ABAD, T.; JIMENEZ, I.A.; RAVELO, A.G.; LUIS, J.G.; AGUIAR, Z.; SAN-ANDRES, L.; PLASENCIA, M.; HERRERA, J. R.; MOUJIR, L. **Biochem. Syst. Ecol.**, 17, (4), p.293-296, 1989.
- GONZALEZ, M. **Dissertação de doutorado-FIOGRUZ**, 1997.
- GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. Mc Graw Hill, 9 ed. p.513-515, 1996.
- GOTTLIEB, O.R.; TAVEIRA, M.M. Modified distillation trap. **Chemist Analyst**. 49, p.114, 1960.
- GOTTLIEB, O.R.; KAPLAN, M.A.C. Simpósio Nacional de Farmacologia dos Produtos Naturais, **Anais João Pessoa**, Edição. Univesitária UFPb, p.167-173, 1983.
- GUENTHER, E. **The Essential Oils**, v I 2 ed. New york: D. Van Nostrand Company p.696-724 (1952 a).
- GUENTHER, E. **The Essential Oils**, v III, 2 ed. New york: D. Van Nostrand Company, p.745-757, 1952 b.
- GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNEMBAUM, S.R. **Analytical Biochemistry**, 126, p.131-138, 1982.
- HAKIZAMUNGU, E.; VAN PUYVELDE, L.; WÉRY, M.; DE KIMPE, N.; SCHAMP N. **Phytotherapy Research**, 2, 4, p.207-208, 1988.
- HENRIQUES, M.G.M.O.; SILVA, P.M.R.; MARTINS, M.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R.S.B. **Med. Biol. Res.**, 20, 243-249, 1987.

- HENRIQUES, M.G.M.O.; WEG, V.B.; MARTINS, M.A.; SILVA, P.M.R.; FERNANDES, P.D.; CORDEIRO, R.S.B.; VARGAFTIG, B.B. **J. Pharmacol.**, 99, p.164-168, 1990.
- HERTZ, H.S., HITES, R.A.; BIEMANN, K. **Phytochemistry**, 43, (6), p.681-691, 1971.
- HINDMARCH, P. , DEMIR, C.; BRERETON, R.G. **Analyst**, 121, p.993-1001, 1996.
- JEAN, F.I.; LOAYZA, I.; ADRYDER, D. **Phytochemistry**, 38 (2), p.381, 1995.
- JOLY, A.B. **Botânica. introdução à taxonomia vegetal**, 3.ed. 4, 571, São Paulo: Nacional, p.582-586, 1976.
- KONSTANTOPOULOU, I.; VASSILOPOULOU, L.; MAVRAGANI-TSIPIDOU, P.; SCOURAS, Z.G. **Experientia**, 48, (6), p. 616-619, 1992.
- KUNDU, A.K.; SHARMA, A.K. **Cytologia**, 53, (3), p.441-445, 1988.
- LOPES, D. **Dissertação de doutorado**, NPPN-UFRJ, 1997.
- MANGIA, R.H.R. **Dissertação de mestrado**, Instituto Oswaldo Cruz- Fio cruz, 1995.
- MARTINS, R.C.C. **Dissertação de mestrado**, UFRRJ, 1998.
- MATTOS, J.K.A. **Hort. Bras.**, 1(1), p.5-10, 1983.
- MCLAFFERT, F.W.; STAUFFER, D.B.; PETERSON, D.W.; ELLIS, R.D. **Anal. Chem**, 57, p.773-776, 1985.
- MCLAFFERTY, F.W.; HERTIL, F.W.; VILLWOCK, R.D. **Anal. Chem.**, 48, p.1362-1368, 1974.
- MENUT, C.G.; LAMATY, P.; WEYERSTAHL, P.; MARSCHALL, H.; SEELMANN I. **Flavour Fragr. J.**,12, p.415-421, 1997.
- MIKAMI, T.; MIYASAKA, K. **Eur. J. Pharm.**, 95, p.1-12, 1993.
- MOMEN, H. Laboratory manual 2 ed., Om Morel (Ed.), UNDP/World Bank/WHO. **Programme for Research and training in Tropical disease**. Finep, CNPq, Fiocruz, 2.2 p.111-120, 1984.
- MOREL, C.M. 1998, Chagas' disease from discovery to control and beyond the advisory Committee on Health Benjamin Osuntokun Memorid lecture, WHO, Geneva.
- Panizzi, L.; Flamini, G.; Cioni, P. L.; Morelli, I. **J. Ethnopharm.** 39, (3), p.167-170. 1993.
- PATTNAIK, S.; SUBRAMANYAM, M.B.; KOLE, C.R. **Microbios**, 89, p.39-46. 1997.
- PESSOA, S.B. **Parasitologia Médica** 5 ed., Rio de Janeiro, p.256-292, 1958.

- PHILLIPSON, N.R. **J. Ethnopharm.** 38, p.145-152, 1994.
- PIO CORRÊA, M.; AZEREDO PENA, L. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 2, p.160-164, 1952.
- POOL, W.G.; LEEUW, J.W.; VAN DE GRAAF, B. **J. Mass Spectrom.**,32, p.438-443, 1997.
- PORTE, A. **Dissertação de mestrado**, UFRRJ, 1999.
- ROCHA E SILVA, M.O. **Brief History of Inflammation. Handbook of Experimental Pharmacology**. Eds. Vane, Jr., Ferreira, S. H., New York: Springer-Verlag, P. 6-25, 1978.
- SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. **Fitoterapia**, LXVIII-1, p.65-68, 1997.
- SERRANO, S.;M.; NOGAL, J.J.; MARTINEZ-DÍAZ, R.A.; ESCARIO, J.R.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A.R.; GÓMEZ-BARRIO, A. **J. Ethnopharm.**, 71, p.101-107, 2000.
- SHELLARD, E. J. **Planta médica**, 48, p.121-123, 1987.
- SIANI, A.C.; RAMOS, M.F.S.; MENEZES-DE LIMA Jr.; SANTOS, R.R.; FERREIRA, E.F.; SOARES, R. O.A.; ROSAS, E.C.; SUSUNAGA, G.S.; CAVALVANTI, A.G.; ZOGHBI, G.B.; HENRIQUES, M.G.M.O. **J. Ethnopharm.**, 66, p.57-69, 1999.
- SILVERSTEIN, R.M. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, , p-11, 1994.
- SILVEIRA, A.C. ; REZENDE, D.F. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil, **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.** São Paulo 27 (Supl. III) p.11-12, 1994.
- SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. **Planta da Medicina Popular no Rio Grande do Sul**, 3 ed., Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre, 1989.
- SKAL TSA, H.D.; LAZARI, D.M.; CHINO, I.B.; LOUKIS, A.E. **Planta Medica**, 65, p.255-256, 1999.
- SOUZA, M. **Dissertação de doutorado**, FIOCRUZ, 1999.
- SPECTOR, W.G. J. **Path. Bact.**, LXXII, p.367-380, 1956.
- STEIN, S.E.; SCOTT, D.R. **J. Am. Soc. Mass Spectrum**, 5, p.859-866, 1994.
- STEIN, S. **J Am Soc Mass Spectrum**, 5, p.316-323, 1994.
- STEIN, S. Comunicação pessoal, 2000.

STEICHER, O. Plant Mono-, Di-and Sesquiterpenoids Activity. Proceedings in life Sciences – **New Natural Products and Plant Drugs With Pharmacological, Biological or Therapeutic Activity**. Wagner, H. and Wolff; Springer-Verlag Berlin Heidelberg (Ed.) New York, p.137-176, 1977.

TORQUILHO, H.S. **Dissertação de mestrado**, UFRJ, 1997.

TÓTH, A.; PRASZNA, L. **Flavour Fragr. J.**,13, p.196-202, 1998.

VAN PUYVELDE, L.; DE KIMBE, N.; BORREMANS, F.; ZHANG, W.; SCHAMP, N. **Phytochemistry**, 26, p.493-495, 1987.

VAN PUYVELDE, L.; DE KIMPE, N. **Phytochemistry**, 49, p.1157-1158, 1998.

VAN PUYVELDE, L.; DE KIMPE, N.; DUBE, S.; CHAGNON-DUBÉ, M.; BOILY, Y.; BORREMANS, F.; SCHAMP, N.; ANTEUNIS, M.J.O. **phytochemistry**, 20, p.2753-2755, 1981.

VAN PUYVELDE, L.; DUBE, S.; UWIMAN, E.; UWERA, C.; DOMMISSE, R.A.; ESMANS, E.L.; SCHOOR, O.V.; VLIETINCK, A.J. **Phytochemistry**, 18, p.1215-1218, 1979.

VAN PUYVELDE, L.; LEFEBVRE, R.; MUGABO, P.; DE KIMBE, N.; SCHAMP, N. **Planta Medica**, 2, p.156-158, 1987.

VAN PUYVELDE, L.; NYIRANKULIZA, S.; PANEBIANCO, R.; BOILY, Y.; GEIZER, I.; SEBIKALI, B.; DE KIMPE, N.; SCHAMP, N. **J. Ethnopharm.**, 17, p.269-275, 1986.

VAN PUYVELDE, L.; PAGEZY, H.; KAYONGA, A. **Afr. Méd.**, 14, (135), p.925-930, 1975.

VENKATARAGHAVAN, R.; PENSYNA, G. M.; DAYRINGER, H.E.; Mclafferty, F.W. **Org. Mass spectrum**, 9, p.690-700, 1969.

VIGNOLIO, L. **Dissertação de mestrado**, UFRRJ, 1998.

JENNINGS, W.G.; SHIBAMOTO, T. 1980 Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography, Academic Press, New York . Weiss, E.A. **Essential Oil Crops, Oxon: Center for Agriculture and Biosciences International**, p.138, 1997.

WELLER, P.F. **Current Opinion in Immunology**, 6, p.85-90, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION Twelfth Programme Report (1995): UNPD/Wolrd Bank/WHO Special Programme for Research and Training Diseases Research, Geneva.Zeina, B.; Othman, O.; al-Assad, S. **J. Altern. Complement. Med.**, 2(3): p.345-348, 1986.

ZELNIK, R.; RABENHORST, E.; MATIDA, A.K.; GOTTLIEB, H.E.; LAVIE, D.; PANIZZA, S. **Phytochemistry**, 17, p.1795-1797, 1978.

ZEMANT, P.D. **Anal. Chem.**, 22, p.920, 1950.

ZIMERMANN, G.A.; PRESCOTT, S.M.; MC INTYRE, T.M. **Platelet-Activating Factor. Inflammation Basic Principles and Clin.** 2 ed.,1992.